

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

HODNOCENÍ FOTOSENZIBILIZAČNÍCH VLASTNOSTÍ LÁTEK

EVALUATION OF PHOTSENSITIZING PROPERTIES
OF SUBSTANCES

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jitka Vytlačilová Ph.D.

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Hradec Králové, září 2012

Lucie Krečmerová

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Hradec Králové

20. 7. 2012

.....

Název: Hodnocení fotosenzibilizačních vlastností látek

Řešitel: Lucie Krečmerová

Pracoviště: Katedra farm. botaniky a ekologie, Farmaceutická fakulta UK

Školitel: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Místo a rok: Hradec Králové, 2012

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá testováním fototoxických vlastností přírodní látky hypericinu, obsaženého v *Hypericum perforatum* a chemických látek chloracetamidu a phenmediphamu v porovnání s fototoxickým standardem bengálskou červení. V experimentech se všemi zmíněnými látkami byly použity dva rozlišné organismy – *Tubifex tubifex* Müll. a *Tetrahymena thermophila*. U kroužkovce *Tubifex tubifex* bylo studováno poškození kutikuly a letální vliv testovaných látek, po ozáření organismu výraznější než bez použití UV záření. U prvoka *Tetrahymena thermophila* byl pozorován inhibiční vliv testovaných látek na růst a množení organismů a i v tomto případě byl výsledek experimentu mnohem výraznější po vystavení organismu UV záření. Výsledné hodnoty měření všech testů byly zpracovány pomocí statistického programu GraphPad Prism 5.04 Project a byly stanoveny hodnoty LC_{50} pro organismus *Tubifex tubifex* a EC_{50} pro organismus *Tetrahymena thermophila*.

Klíčová slova: *Tubifex tubifex*, *Tetrahymena thermophila*, LC_{50} , EC_{50}

Title: Evaluation of photosensitizing properties of substances

Author: Lucie Krečmerová

Department of farmaceutical botany and ecology, Faculty of farmacy, Charles University

Supervisor: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Place and year: Hradec Králové, 2012

ABSTRACT

This work reports on testing fototoxic prosperities of hypericine, which can be found naturally in *Hypericum perforatum*, and chemical substances chloracetamide and phenmedipham. Results are compared with Rose Bengal fototoxic standard. Tests were done with two different species: *Tubifex tubifex* Müll. and *Tetrahymena thermophila*. Results indicate that the *Tubifex tubifex* annelid is more sensitive to skin damage and lethal influence of the tested substances after exposure to UV radiation. Inhibition of growth and propagation of the *Tetrahymena thermophila* protozoa was also higher after UV irradiation. LC₅₀ value for *Tubifex tubifex* and EC₅₀ value for *Tetrahymena thermophila* were determined after processing all experimental data with GraphPad Prism 5.04 Project statistical software.

Keywords: *Tubifex tubifex*, *Tetrahymena termophila*, LC₅₀, EC₅₀

OBSAH:

1. ÚVOD	8
1.1. Cíl práce	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1. Záření	10
2.1.1. Sluneční záření	10
2.1.1.1. UV záření	11
2.1.2. Atmosféra	11
2.1.3. Ozónová vrstva	11
2.1.4. UV záření a organismus	12
2.1.4.1. Nižší organismy	12
2.1.4.2. Člověk	13
2.1.4.2.1. Kůže	14
2.1.4.2.2. Zrakový orgán	15
2.1.5. Další efekt UV záření	15
2.2. Fototoxicita	15
2.2.1. Definice	15
2.2.2. Mechanismy a projevy poškození organismu	16
2.2.2.1. Fototoxická reakce	16
2.2.2.2. Fotoalergická reakce	16
2.2.3. Fotoaktivní sloučeniny	17
2.2.3.1. Reaktivní forma kyslíku a její účinky	18
2.2.4. Sekundární fytotoxické metabolity rostlin	19
2.2.4.1. Hypericin	19
2.2.5. Fotoprotektivní léčiva	21
2.2.6. Léčba světelným zářením	22
2.2.6.1. Fototerapie	22
2.2.6.2. Fotochemoterapie	22
2.2.6.2.1. Indikace terapie	23
2.2.7. Testy fototoxicity na nižších organismech	24
2.3. <i>Tubifex tubifex</i>	25
2.3.1. Taxonomické členění	25

2.3.2. Stavba těla	25
2.3.3. Dýchání a způsob potravy	27
2.3.4. Biologie a vztah k toxicitě	28
2.3.5. Nitěnka jako hostitel <i>Myxobolus cerebralis</i>	29
2.4. Tetrahymena	30
2.4.1. Taxonomické členění	30
2.4.2. Obecné poznatky o protozoích	30
2.4.3. Stavba eukaryotické buňky	31
2.4.4. Fototoxicita a <i>tetrahymena</i>	32
2.4.5. Nemoci způsobené prvoky	33
2.4.6. Léčiva používaná proti protozoárním infekcím	33
2.4.7. Metanogenní symbionti anaerobních prvoků	34
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
3.1. Metodika testu	35
3.1.1. Testování na organismu <i>Tubifex tubifex</i> Müll.	35
3.1.1.1. Design testu	35
3.1.1.2. Preliminary test	35
3.1.1.3. Vlastní test.....	35
3.1.1.4. Hodnocení testu.....	36
3.1.2. Vícegenerační test s <i>Tetrahymena thermophila</i>	37
3.1.2.1. Design testu.....	37
3.1.2.2. Preliminary test	37
3.1.2.3. Vlastní test	37
3.1.2.4. Hodnocení testu	38
3.2. Princip výpočtu fotoiritačního faktoru	39
3.3. Chemikálie, přístroje a testované organismy	39
3.3.1. Chemikálie	39
3.3.2. Přístroje	40
3.3.3. Testované organismy	40
3.3.3.1. <i>Tubifex tubifex</i> Müll.	40
3.3.3.2. <i>Tetrahymena thermophila</i>	41
3.4. Použité látky	41
3.4.1. Bengálská červeň	41
3.4.2. Hypericin	42

3.4.3. Chloracetamid.....	42
3.4.4. Phenmedipham	43
4. VÝSLEDKY.....	44
4.1. Test fototoxicity na <i>Tubife tubifex</i>	44
4.2. Vícegenerační test s <i>Terahymena thermophila</i>	47
5. DISKUSE.....	52
6. ZÁVĚR.....	58
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	60

1. ÚVOD

Součástí všudypřítomného a nezbytného slunečního záření je mimo jiné i záření ultrafialové (UV). Různé vlnové délky UV záření mají i různý účinek, přičemž může být zdraví škodlivý nebo někdy prospěšný.

Každý organismus na Zemi je vystaven paprskům UV záření čím dál více. Děje se tak kvůli stálému ztenčování ozónové vrstvy – důsledek lidské činnosti. Toto záření, které tedy proniká atmosférou ve zvýšené míře je pro organismy velmi škodlivé. Lidé si proto mohou pomoci používáním fotoprotektivních látek, jakými jsou například deriváty kafru nebo oxid zinečnatý. Kůži chrání dvojím mechanismem účinku buď pohlcováním, nebo odražením nebezpečného UV záření.

Prospěšné účinky ultrafialového záření zaznamenáváme především v medicíně a to v léčbě různých karcinomů nebo v dermatologii. Dělí se na dva typy – fototerapie a fotochemoterapie, kde se kromě UV záření používá navíc ještě fotosenzibilizační látka.

Člověk je na UV záření daleko více citlivý, pokud je zároveň aplikována fotosenzibilizační látka. Ať už je dané ultrafialové záření škodlivé nebo v podobě terapie. Jde o látky (přírodní i chemické) schopné absorbovat sluneční záření a vyvolat tak na kůži reakci toxickou nebo alergickou. Do této skupiny látek se řadí například některé sekundární metabolity rostlin nebo některá léčiva.

Právě proto je nyní důležité poznávat látky s fotosenzibilizačním potenciálem, jejich strukturu a mechanismus účinku. V dnešní době jsou nejvíce vyhledávány alternativní testovací metody na nižších organismech, pro jejich jednoduchost a rychlost provedení a také z důvodu možnosti menšího počtu testů fototoxicity na obratlovcích. Nižší organismy, které slouží k tomuto účelu, jsou například kroužkovec *Tubifex Tubifex* Müll. nebo nálevník *Tetrahymena thermophila*.

1.1. Cíl práce

Na dvou modelových organismech (*Tubifex tubifex*, *Tetrahymena thermophila*) otestovat látky, které se používají v praxi a mohou vykazovat fotosenzibilizující efekt ve srovnání se standardem fotosenzibilizující látky - bengálskou červení. Rozšířit tak spektrum alternativních testů (*in vivo*), které by mohly v budoucnu nahradit obratlovce při screeningu fotosenzitivních látek.

Mezi zvolené testované látky patří: hypericin, chloracetamid, phenmedipham.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Záření

2.1.1. Sluneční záření

Sluneční záření představuje základní zdroj energie pro veškeré procesy probíhající na zemském povrchu i v atmosféře. Vzniká v nitru slunce jadernými přeměnami. Jedná se o elektromagnetické záření o různých vlnových délkách. Část záření, která spadá do citlivosti oka, se nazývá viditelná oblast světla. Kratší vlnové délky má záření ultrafialové (UV), delší vlnové délky záření infračervené, které člověk vnímá jako teplo. Světlo se zapojuje do velké části reakcí, které přispívají k tvorbě mnoha organických látek, také jejich degradaci a tím se podílejí na chemické rovnováze celé planety.

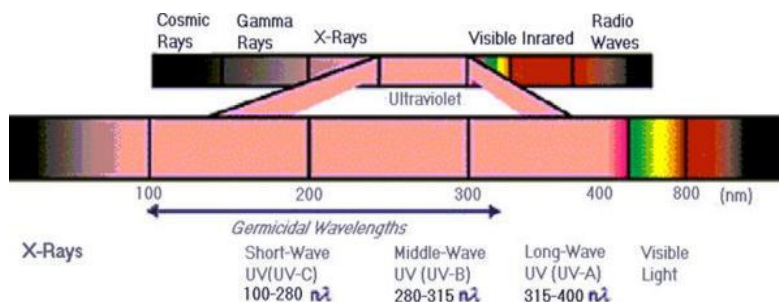
Viditelné sluneční záření má vlnovou délku 400 – 780nm. Následuje infračervené záření, jehož vlnová délka je mezi 780nm a 1mm, tedy větší než viditelné světlo, ale menší než mikrovlnné záření. UV záření se nachází mezi rentgenovým zářením a viditelným světlem v rozsahu vlnových délek 100 – 400nm. Může být produkováno i uměle – obloukovými lampami například rtuťovými. Dle závislosti různých účinků se rozlišují pásma:

UVA 400-315nm

UVB 315-280nm

UVC 280-200nm

UV vakuum 200-100nm (<http://iuva.org/what-uv>).



Obr. 1: Spektrum záření

(<http://www.h2o-logic.cz/technicke-aspekty/uv-zareni.html>)

2.1.1.1. UV záření

UVA způsobuje na lidské kůži opálení – fotooxidaci melaninu v pigmentových buňkách, podráždění až poškození pokožky a má vliv na možný vznik melanomu. UVB je záření silnější, s větší intenzitou v létě a je zodpovědné za spálení kůže od slunce, zarudnutí, tvorbu puchýřků a kožního karcinomu. Expozice organismu může vyvolat řadu dalších nežádoucích účinků. Jako je zánět oční rohovky, snížení fotosyntézy, oslabení imunitního systému nebo v horším případě až karcinom kůže. Středněvlnné UVB záření proniká pouze do epidermis a UVA prochází až do vrstev podkožních. UVC je absorbováno v DNA a proto je převážně právě UVC zodpovědné za mutace a rakovinu. Je to nejsilnější a nejvíce škodlivá složka UV záření. Naštěstí téměř všechno UVC záření je zachycováno v ozónové vrstvě, která se nachází ve stratosféře. Část záření, která pronikne ozónem je potom zachycena běžným okenním sklem nebo vrstvou oblečení (<http://iuva.org/what-uv>; Anders, M., 2009).

2.1.2. Atmosféra

Stratosféra je jednou z vrstev atmosféry, dosahuje výšky až 60km. Vrstvy atmosféry se dělí na troposféru, stratosféru, mezosféru, termosféru a exosféru podle různé teploty. Společně tvoří vzduchový obal Země. S rostoucí výškou se zmenšuje hustota vzduchu, atmosféra řídne a přechází do meziplanetárního prostoru. Nemá sice pevnou hranici, ale výška termosféry dosahuje až několika set kilometrů. Atmosféra je tvořena dvěma hlavními plynnými složkami – dusíkem (78%) a kyslíkem (21%). Další součásti tvoří oxid uhličitý, vodní pára, vzácné plyny a atmosférické aerosoly. Aerosoly se do ovzduší dostávají buď činností člověka, nebo jde převážně o kosmický prach (Stonawski, J., 1993).

2.1.3. Ozónová vrstva

Nachází se 25 – 30 km nad zemským povrchem a skládá se z tříatomové molekuly kyslíku. Ozón vzniká působením krátkovlnného UV záření (UVC)

na molekuly kyslíku, případně elektrickými výboji, jako jsou blesky, ve stratosféře. Část ozónu se nachází i v troposféře, je opakem zdraví prospěšného stratosférického ozónu. Vzniká v létě v horku jako produkt spalování fosilních paliv. Jinak řečeno se jedná o fotochemický smog. Poškozuje dýchací orgány a způsobuje astmatické záchvaty.

V atmosféře dochází přirozenými procesy k tvorbě a zániku O_3 a je možné je popsat stovkou chemických reakcí. Důležité však je udržet tvorbu i zánik v konstantním poměru. V posledních letech však tuto rovnováhu narušuje člověk. K úbytku ozónu dochází působením oxidů dusíku, například vlivem motorových letadel. Největší hrozbou jsou ale sloučeniny fluorochlorouhlovodíků. Pokles koncentrace stratosférického ozónu se označuje jako ozónová díra, pokud se koncentrace ozónu zmenší o 50% po dobu 6 týdnů. Způsobuje intenzivnější pronikání UV záření k zemskému povrchu a má negativní vliv nejen na člověka, ale i na životní prostředí. Například na vývoj fytoplanktonu v mořích – největší zdroj zemského kyslíku, na výnos zemědělských plodin a může dokonce ovlivňovat genetické vlohy rostlin i živočichů (http://www.sci.muni.cz/~dobro/ozon_1.htm).

2.1.4. UV záření a organismus

Při expozici biologických organismů UV záření je rozhodující rozsah vlnových délek od UVA přes UVB do UVC. Škodlivé (nebo někdy i prospěšně účinné) jsou pouze ty složky paprsků, které jsou pohlcovány. Znamená to, že nutně musí dojít k absorpci v důležitých složkách biologického organismu – tedy v nukleových kyselinách a v proteinech. Ze všech aminokyselin mají hlavně 3 charakteristickou absorpci UV paprsků. Jedná se o tyrosin, tryptofan a fenylalanin (<http://iuva.org/what-uv>).

2.1.4.1. Nižší organismy

UV záření nachází využití zejména pro desinfekci vody a vzduchu. Tato metoda desinfekce nemění chemické ani fyzikální vlastnosti vody, nemá vliv na změnu obsahu minerálů ve vodě ani na její chuť. Má okamžitý účinek.

Důležitá je právě ta část spektra, která je absorbována DNA (nebo RNA v některých virech). Jedná se o paprsky přibližně mezi 200-300nm s nejvyšší účinností kolem 260nm (tedy UVC). Proniká ochrannou bariérou, kterou tvoří cytoplasmatická membrána, do jádra. Dochází zde k fotochemické reakci a tvorbě dimerů tymidinových bází, a tím je blokována vazba tyminu na adenin. Organismy jsou umrtvovány, protože je zabráněno rozmnožování buněk i jejich látkové výměně. Citlivost jednotlivých organismů na UV paprsky je velmi rozmanitá. Ovlivňuje ji druh organismu, jeho fyziologický stav a také vlastnosti okolí. UV záření také znemožní reparaci poškozených nukleových kyselin a tím opětovného pomnožení mikroorganismů. Eliminuje tedy nejen řadu bakterií, ale i virů a parazitů (<http://iuva.org/what-uv>).

2.1.4.2. Člověk

Účinky UV záření na člověka mohou být prospěšné i škodlivé.

Jediný prospěšný efekt UV záření pro člověka, potvrzený studiemi, je jeho podíl na metabolismu kalcia. Spektrum důležité pro tvorbu vitamínu D je UVB oblast. Vitamin D zlepšuje ukládání vápníku do kostí a jeho nedostatek se může projevit rachitidou (u dětí) nebo osteomalácií (u dospělých). Cílené využití UV záření nalezneme v dermatologii při fototerapii a fotochemoterapii.

Stanovit hranici mezi prospěšnými a škodlivými účinky UV záření pro člověka je však velmi obtížné. Rozumné dávky slunečního záření navozují pocit výkonnosti a svěžesti.

Naneštěstí škodlivé účinky nekompromisně převažují, přičemž nejvýraznější biologické účinky jsou přisuzovány UVB. Mohou se dělit podle místa, kde se tyto účinky projevují. Jde hlavně o interakci záření a kůže a interakci záření a zrakového orgánu. (Anders, M., et al., 2009; Malina, L., 1999)

2.1.4.2.1. Kůže

Po dopadu záření na kůži se část odrazí a část projde do tkáně, kde dojde k absorpci. Přírodním absorbentem v epidermis je melanin a nukleové kyseliny, v dermis hlavně hemoglobin, ale i bilirubin a beta-karoten. V přípravcích určených k opalování se využívá exogenních absorbentů jako je například hematoporfyrin (Malina, L., 1999).

Záření pronikne až k DNA, poškodí ji. Poničené membránové struktury i DNA se brání uvolněním cytokinů a dalších zánětlivých mediátorů. Důsledkem této fotochemické reakce je zánět, erytém, edém (de Gruijl, F., R., et al., 2003), hyperplazie epidermis a pigmentace kůže. Akutní účinky záření jsou zánět a pigmentace, naopak chronické jsou karcinogeneze a degenerativní změny. Dalším důsledkem je hypertrofie elastické tkáně projevující se jako stárnutí kůže (Anders, M., et al., 2009).

Mediátory zánětu způsobeného sluncem jsou především prostaglandiny a histamin. Erytém – zčervenání kůže se projevuje kvůli rozšíření kapilár. Pigmentace kůže je jedním z hlavních ochranných mechanismů kůže proti traumatizaci UV zářením. Avšak nejúčinnějším faktorem fotoprotekce je keratin, tedy zesílení epidermis. Hyperplastické změny jsou následkem zvýšené syntézy DNA a bílkovin s mnohonásobným zvýšením mitotické aktivity keratinocytů. Epidermis i korium se ztlušují až čtyřnásobně a tato změna trvá až několik měsíců (de Gruijl, F., R., et al., 2003, Malina, L., 1999).

Důležité je zmínit, že také existuje řada ochranných prostředků proti UV záření. Dočasnou ochranu poskytují přípravky určené k podání na kůži, obsahující ochranný faktor, který je daný koncentrací a druhem UV filtrů. Tyto prostředky chrání kůži dvojím způsobem – fyzikálně (rozptylují záření) a chemicky (absorbují energii záření). Ochranný faktor proti světelnému záření udává, kolikrát se musí zvýšit dávka světla nebo délka expozice, aby při užití ochranného prostředku došlo k vyvolání minimálního erytému. Běžný krém na opalování by měl mít ochranný faktor minimálně 8 (Malina, L., 1999).

2.1.4.2.2. Zrakový orgán

UVC záření vyvolává především zánět spojivky a rohovky, je absorbováno rohovkou a neproniká hlouběji do oka. Na rozdíl od UVA a UVB záření, která jsou absorbována až oční čočkou. Vzniká tak katarakta – šedý zákal – zhoršení zrakové ostrosti, která je poruchou průhlednosti oční čočky.

Ochrana zrakového orgánu spočívá v nošení slunečních brýlí s potřebným UV filtrem. Brýle nechrání oči pouze před UV zářením, ale také před nadměrnými účinky infračerveného záření (teplem) a před nadměrným oslněním (Fremuth, F., 1981).

2.1.5. Další efekt UV záření

Dle studie Misry a kolektivu je škodlivý efekt UV záření prokázaný i na lidské červené krvinky. Erytrocyty byly ozařovány několika různými dávkami UV záření po dobu 0-240min. Bylo zpozorováno, že lýza erytrocytu vzrůstá se zvětšující se dávkou záření i s časem. Také byla zaznamenána znatelná inhibice aktivity ATPasy, acetylcholinesterasy a glukoso-6-fosfát dehydrogenasy. Toto zjištění dokazuje, že by lidské erytrocyty mohly být používány ke zkoumání efektů UV záření a k porozumění možného mechanismu fototoxicity (Misra, R., B., et al., 2005).

2.2. Fototoxicita

2.2.1. Definice

Jde o toxickou reakci, ke které dochází, je-li kůže poprvé vystavena daným chemickým látkám a následně světlu, nebo pokud je kůže ozářena po celkovém podání určité látky. Tyto látky, které absorbují záření a provokují reakci na kůži, která byla vystavena slunečnímu záření, se souhrnně nazývají fotosenzibilizátory. Fototoxický potenciál mají některé chemické látky, některé obsahové látky rostlin a nejrůznější léčiva, desinfekční a kosmetické přípravky, potravinová aditiva, umělá sladidla nebo i barviva textilu (Gould, J., et al., 1995).

2.2.2. Mechanismy a projevy poškození organismu

Podle mechanismů, které se uplatňují při poškození kůže, se reakce dělí na fototoxické a fotoalergické.

2.2.2.1. Fototoxická reakce

Fototoxicita nezávisí na imunitní odpovědi, ale na dávce UV záření. Patří k běžným kožním reakcím a může se vyskytnout u kteréhokoliv jedince, pokud předem byl aplikován fotosenzibilizér. Dávka UV záření, která tuto reakci vyvolá je velmi individuální. Nejúčinnější vlnové délky pro vyvolání reakce jsou obvykle dlouhovlnné paprsky UVA oblasti spektra. Klinický obraz spálení kůže je úměrný koncentraci fotosenzibilizéru v tkáni, jeho fotosenzibilizačnímu potenciálu a dávce absorbované zářivé energie. Fototoxická reakce se může objevit po první expozici dané látky a nemusí se znovu projevit u látek chemicky podobných (Dubaiene, R., et al., 2006).

Klinickými projevy jsou typické zarudnutí, prosáknutí kůže, někdy i s tvorbou puchýřků a nekróz. Doprovázené subjektivním pálením a bolestivostí kůže. Tuto reakci může vyvolat například třezalkový čaj nebo dražé (hypericin). Jiné léky mohou způsobit po oslunění až jizvení a hyperpigmentace (Epstein, J., H., 1999).

2.2.2.2. Fotoalergická reakce

Fotoalergie je v porovnání s fototoxicitou relativně vzácná. Jde o reakci zprostředkovanou imunologicky (reakce IV. typu vzniká pomocí T-lymfocytů – pozdní buněčný typ). Projevuje se pouze u citlivých jedinců po předchozí fázi senzibilizace a není závislá na dávce. Po ozáření se léčivo mění na fotoantigen, který vyvolává imunitní reakci podobnou kontaktní alergické dermatitidě. Chemicky podobné látky mohou způsobit obdobnou reakci jako látka, která jí již způsobila. Jedinec, u kterého se fotoalergická reakce jednou projevila, bude vždy na dané spektrum látek velmi citlivý. Většina fotoalergických reakcí

je zaznamenána po topických přípravcích jako jsou například antiseptika, lokální antiflogistika nebo vonné substance.

Klinický obraz zpravidla odpovídá svědícím ekzémovým projevům a erytému. Vyrážka je často neostře ohraničená a šíří se i za hranice ozáření. U chronických stavů může převládat šupinatění (Epstein, J., H., 1999).

Přesné rozlišení fototoxicity a fotoalergie podle klinického obrazu často není možné, a proto se v praxi běžně používá obecný termín fotosenzitivní reakce (Dubai kiene, R., et al., 2006; Ditrichová, D., 2008).

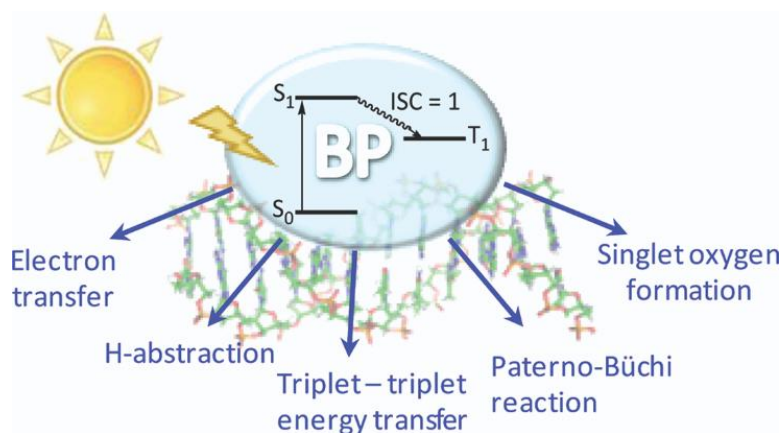
Terapie fototoxických i fotoalergických reakcí je symptomatická. Spočívá v zabránění kontaktu s fototoxiny a ve fotoprotekci, pokud není možné se fototoxinům vyhnout. Fotoprotekce je důležitá kvůli souvislosti, která byla zjištěna mezi fotosenzibilizačními reakcemi a karcinogenitou. Při vzniku reakce jsou podávány kortikosteroidy. U fotoalergických reakcí je důležité identifikovat riskantní sloučeniny a eliminovat je z prostředí (Malina, L., 1999).

2.2.3. Fotoaktivní sloučeniny

Do mechanismu fotochemické a fotobiologické reakce je často zapletena reaktivní forma kyslíku a další volné radikály.

Sloučeniny, které ve své chemické struktuře obsahují chlór, například hydrochlorothiazid nebo chlorpromazin, projevují fotochemickou aktivitu, kvůli zjištěné disociaci substituentu chlóru. Chlór jako volný radikál reaguje s lipidy, proteiny a DNA. Mechanismus reakce pro nesteroidní antiflogistika, osahující ve své struktuře 2-arylpropanovou kyselinu, je dekarboxylace kyseliny s následnou reakcí vzniklého radikálu. S vysokou účinností reagují nasycené singletové formy reaktivního kyslíku karboxylové skupiny. Nesteroidní antiflogistika bez arylpropanové kyseliny jsou také fotoaktivní, ale mají jiný mechanismus účinku. Fotosenzitivní benzofenony ničí molekulu DNA hned několika způsoby (obr. č. 2). Ze skupiny léků jsou nejvíce fotoaktivní antibakteriální léky - tetracykliny, fluorchinolony a sulfonamidy. Fotokontaktní

dermatitidu způsobují lokální anestetika, přípravky proti akné a další kosmetické prostředky (Moore, D., E., 2002).



Obr. 2: Mechanismus účinku benzofenonů

(Cuguerella, M., C., et al., 2012)

2.2.3.1. Reaktivní forma kyslíku a její účinky

Termínem singletový kyslík je označována molekula kyslíku v excitovaném stavu, v němž jsou všechny elektrony spárovány, takže multiplicita spinu je 1, tedy singlet. Singletový kyslík vzniká řadou fyzikálních, chemických, fotochemických nebo biologických reakcí. K fotochemickým patří fotolýza ozónu ve vyšších vrstvách atmosféry, fotolýza komplexů s přenosem náboje kyslík-organická molekula a fotoexcitace molekulárního kyslíku. Souhrnně se označují jako fotodynamický efekt (Rychtáriková, R., et al., 2009; Lang, K., et al., 2005).

Fotodynamické reakce nalézají široké uplatnění ve fotobiologii, při inaktivaci bakterií a virů, v nových insekticidech a ve fotomedicíně při léčbě rakoviny nebo aterosklerosy. Fotodynamická terapie rakoviny spočívá v aplikaci fotosenzitizátoru, obvykle intravenózní formou. Po uplynutí doby nutné k selektivní akumulaci senzitizeru v tumoru je oblast jeho lokalizace ozářena viditelným světlem. Singletový kyslík, případně další reaktivní částice v excitovaném stavu, vznikají přímo v tumoru a způsobují jeho oxidativní destrukci, aniž by byla poškozena okolní zdravá tkáň. Výsledným terapeutickým efektem je nekróza, současně s apoptózou nádorových buněk.

Senzitizátor se absorpcí světelného kvanta dostává do excitovaného singletového stavu, který rychlou relaxací přechází na nejnižší excitovaný singletový stav. Tento stav se spontánně deaktivuje vnitřní konverzí, vyzářením přebytečné energie ve formě fluorescence nebo mezisystémovým přechodem do tripletového stavu. Tripletové stavy senzitizerů mají poměrně dlouhou dobu života a mohou se zúčastňovat řady bimolekulárních interakcí (Lang, K., et al., 2005).

2.2.4. Sekundární fototoxické metabolity rostlin

Důvod tvorby fototoxických sloučenin u rostlin je funkce ochranná proti hmyzu. Tvoří je široké spektrum látek. Jedná se o sekundární metabolity, které indukují fotooxidační děje u živočichů, kteří se těmito rostlinami živí. Nejefektivněji se obranný efekt projeví, nachází-li se rostlina na slunném stanovišti. Produkují je například rostliny z čeledi *Asteraceae* nebo *Hypericaceae*.

2.2.4.1. Hypericin

Hlavní obsahovou látkou v třezalce tečkované (*Hypericum perforatum*, *Hypericaceae*) je dimer anthronu hypericin.



Obr. 3: *Hypericum perforatum*

(<http://www.guenther-blaich.de/pflgs.php?par=bimi&lan=e&fm=pflfamla>)

V roztoku je jasně červený. Jde o potenciální fotosenzitizer, který po systémovém podání navozuje fototoxicitu. Poprvé byla tato jeho vlastnost objevena po požití larvou, která byla poté vystavena slunečnímu záření. Bylo

zjištěno, že v přítomnosti filtru nebo nepřítomnosti slunečního světla, larva nebyla poškozena (Sandberg, L., 1989).

Hypericin může být také připraven synteticky z antrachinonového derivátu emodinu. V historii byl tradičně používán k lidovému léčení, v poslední době se stal objektem intenzivního biochemického výzkumu a bylo prokázáno jeho multifunkční působení. Nedávné studie informovaly o jeho účincích antidepresivních, antineoplastických, antitumorních a antivirových (žloutenka typu C). V současných studiích se testuje hypericin pro svůj inhibiční efekt na různé farmaceuticky důležité enzymy, jako jsou MAO, proteinkinasa C, dopamin-beta-hydroxylasa, reverzní transkriptasa a cytochrom P450. Také v relativně nově zavedených oblastech výzkumu medicínské fotochemie a fotobiologie se odhalil efekt hypericinu v léčbě a diagnostice rakoviny (fotodynamická aktivace volných radikálů) (Kubin, A., et al., 2005).

Pro lepší pochopení fotodynamické terapie byla uskutečněna studie o ovlivnění akumulace a šíření hypericinu v nádorech. Existuje blízká souvislost mezi vstřebáváním hypericinu v nádorech a cévní permeabilitou v nádoru. Důležitou roli v transportu hypericinu stěvnou stěnou hrají lipoproteiny. Pomocí fluorescenčního mikroskopu byla provedena vizuální a kvantitativní analýza hypericinu a označených lipoproteinů. Dynamická reakce těchto dvou látek proběhla velmi rychle po podání injekce, zatímco posun v lokalizaci lipoproteinu a hypericinu byl viditelný až po 24 hodinách. Naznačuje to, že v průběhu jejich migrace stěnou tumoru je hypericin uvolňován z komplexu s lipoproteinem. Nahromadění hypericinu v nádoru je zásadně ovlivněno kombinací biologických (krevním oběhem, permeabilitou cév) a fyzicko-chemických prvků (afinita k intersticiálním složkám). Ložisko tumoru při pokusu bylo zničeno 6 hodin po intravenózní aplikaci hypericinu (Van de Putte, M., et al., 2005).

Mechanismus a místo působení hypericinu na buněčné úrovni zůstává nejasný, ale pravděpodobně způsobuje fotosenzibilizaci na kyslíku závislou a produkuje singletový kyslík. Je také schopný vyvolat fotogenerovaný intracelulární pokles pH, který může být alternativním mechanismem působení hypericinu. Pokles intracelulárního pH vede k uvolnění hexokinasy vázané

v mitochondriích, a to vede ke snížení fosforylace glukosy, obsahu ATP a buněčné proliferace. Při léčbě lidského gliomu hypericinem došlo po expozici světlem ke snížení intracelulárního pH. Za těchto podmínek (závislých na světle a dávce hypericinu) došlo k inhibici hexokinasy, spojené se snížením obsahu ATP, snížením mitochondriálního transmembránového potenciálu a nedostatku intracelulárního glutathionu. Protein hexokinasa byl uvolněn z mitochondrie. Tato studie potvrzuje, že mitochondrie funguje jako primární cíl fotodynamické reakce (Miccoli, L., et al., 1998).

2.2.5. Fotoprotektivní léčiva

Fotoprotektivní látky chrání kůži před negativním působením buď paprsků celého spektra slunečního záření (zinci oxidum, calcii carbonas, titani dioxidum, zirconii dioxidum), nebo slunečního záření určitých vlnových délek.

Jako první se objevila varování před škodlivým vlivem krátkovlnného UVC záření z umělých zdrojů, poslední dobou rizika spojená s UV zářením této vlnové délky nabývají na významu v souvislosti se ztenčováním ozónové vrstvy. V důsledku nadměrného ozařování kůže dochází k degenerativním změnám vaziva, stárnutí kůže a poškození DNA, které může vést k mutacím genetické informace a ke vzniku nádorového bujení.

Cílem fotoprotektivních látek je zabránit důsledkům působení UV záření na kůži a u rizikových osob (například pacientů ošetřovaných laserem, po chirurgických zákrocích nebo pacientů s fototoxickými reakcemi v anamnéze) pak případně i působení záření z oblasti viditelného spektra. Fotoprotektivní látky většinou absorbují paprsky a mění světelnou energii na tepelnou. UVB paprsky filtrují a vzniku erytému brání benzofenony, deriváty kyseliny salicylové, deriváty kafru nebo tannin a chinin sulfát. Umožňují také vznik pigmentace (Anders, M., et al., 2009; Ettler, K., 2007).

V poslední době se začínají uplatňovat i látky působící na základě spojeném nikoliv s pohlcováním paprsků, ale i s odrážením paprsků. Patří mezi ně oxid titaničitý, oxid zinečnatý. Jejich nevýhodou byl vzhled po natření

(nepravidelné zbarvení kůže), což je dnes díky novým výrobním postupům překonáno. Velmi slabý fotoprotektivní efekt mají perorálně podávané karotenoidy (betacaroten) absorbující pouze malé množství UVB. Samoopalovací krémy v závislosti na svém složení buď fotoprotektivní účinek nemají, nebo ho mají pouze částečný. Jejich efekt (zbarvení pokožky) je obvykle založený na chemickém vyvolání tvorby melaninu v kůži bez účasti slunečního záření. Takto vzniklé barvivo však neposkytuje kůži při jejím vystavení slunečnímu záření dostatečnou ochranu (Anders, M., et al., 2009).

2.2.6. Léčba světelným zářením

Fototerapie se využívá v několika odvětvích medicíny, například již výše zmíněná léčba různých karcinomů, léčba světlem také zabírá u některých typů deprese. Pomocí fototerapie se v dnešní době léčí také novorozenecká žloutenka nebo se s její pomocí vyhlazují jizvy po akné (aktivuje fibroblasty k novotvorbě kolagenu), avšak nejrozsáhlejší uplatnění má v oboru dermatologie. Kromě fototerapie se využívá i fotochemoterapie.

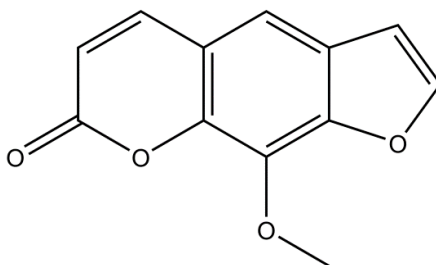
2.2.6.1. Fototerapie

K dosažení léčebného účinku se nemocní vystavují neionizujícímu ultrafialovému záření – UVB i UVA, jejich různým kombinacím a různým šířkám pásem spektra. Léčebně se při fototerapii využívají účinky imunomodulační (imunosuprese) – UV záření indukuje apoptózu keratinocytů, T-lymfocytů. Před zahájením fototerapie je nutné určit fototyp pacienta, stanovit minimální dávku záření, při které ještě nevznikne erytém a na základě toho stanovit počáteční dávku k ozařování a zároveň celý léčebný postup. UVB fototerapii lze užívat v monoterapii, ale častěji se kombinuje s lokální léčbou steroidy nebo fotoprotektivními deriváty vitamínu D₃ (Bernardová, J., 2011).

2.2.6.2. Fotochemoterapie

Fotochemoterapie (PUVA) také používá UV záření, ale v kombinaci s fotosenzibilizující látkou, která se podá buď jen místně (mast, koupel) nebo

systémově (tablety, kapsle). V ČR je jako jediný fotosenzibilizátor pro PUVA terapii registrován 8 – methoxypsoralen, Oxsoralen cps. Psoraleny se aditivně váží na jadernou DNA – vstupují do vazeb mezi pyrimidinovými bazemi. Po ozáření se tato vazba stává pevnou – kovalentní. Dochází tak k zablokování mitózy. Tento typ terapie také vyžaduje určení počáteční dávky záření i léčiva – stanovuje se minimální fototoxická dávka. Dále je nutné opakovat jaterní testy, vzhledem k hepatotoxickému účinku psoralenu (<http://fbmi.sirdik.org/8-kapitola/86.html>).



Obr. 4: Vzorec 8-methoxypsoralenu

2.2.6.2.1. Indikace terapie

Konkrétní dermatologická onemocnění, u kterých je možné tento typ terapie použít jsou například psoriáza, ekzém, vitiligo, atopická dermatitida, akné, bradavice, pruritus.

Při léčbě vitiliga se využívá schopnosti UVB podporovat dělení, migraci a aktivaci melanocytů.

Léčba psoriázy probíhá buď lokálně, nebo celkově. Lokální léčba využívá keratolytické účinky kyseliny acetylsalicylové v masti. Deriváty vitamínu D (kalcipotriol a takalcitol) inhibují diferenciaci buněk a jejich proliferaci. Celková léčba je nutná u těžších forem psoriázy a jedná se převážně o výše zmíněnou fotochemoterapii. Zlepšení onemocnění se projeví během několika týdnů. V terapii psoriázy se také mohou uplatňovat glukokortikoidy – místní i celkové, methotrexát nebo cyklosporin (Lüllmann, H., et al., 2004).

Fototerapie těžší novorozenecké žloutenky probíhá pomocí modrého světla. Tato část spektra rozkládá bilirubin (vzniká rozpadem červených krvinek)

a přeměňuje ho na netoxické deriváty, které jsou snadno vylučitelné močí. Vhodný úsek modré části spektra se pozná podle dosaženého maxima absorpce bilirubinu. Při terapii je velmi nutná ochrana očí kvůli možnosti degenerativních změn na sítnici (Ebbesen, F., et al., 2003).

2.2.7. Testy fototoxicity na nižších organismech

Organismy, které patří do této kategorie, jsou prvoci, bakterie, bezobratlí a ryby.

Předností těchto testů je hlavně jednoduchost, reprodukovatelnost, finanční nenáročnost i rychlost – trvají mnohem kratší dobu než testy *in vivo* na vyšších organismech.

Záporem je snad jenom horší extrapolace na vyšší organismy a tím i na člověka. Důvodem jsou velké odlišnosti v biologickém uspořádání obratlovců.

Studie mechanismu fototoxicity jsou velmi často prováděny na druhu *Tubifex tubifex* Müll. Studují se prahové dávky dané látky, kdy už začíná toxická reakce po určité době ozařování. Mechanismus byl posuzován pomocí produkce reaktivních forem kyslíku (Misra, R., B., et al., 2002).

Alternativním modelem pro hodnocení fototoxicity může být také *Tetrahymena thermophila* (Misra, R., B., et al., 1999). Zajímavá je i studie, kde se porovnávala toxicita a fototoxicita blefarisminu a oxiblefarisminu s hypericinem. Tyto dvě látky se nacházejí v pigmentu obrveného prvoka *Blepharisma japonicum*. Ukázalo se, že oxiblefarismin má účinky jak toxické, pokud nebyl vystaven slunečnímu záření, tak i fototoxické. Proto byly jeho vlastnosti porovnávány právě s hypericinem, který je známý jako typický a silný fotosenzitizér. Ukázalo se, že blefarismin i oxiblefarismin mají bez ozáření výraznou vnitřní toxicitu na zkoumaný organismus. Zato ale jejich fototoxicita byla oproti hypericinu slabší (Terezima, M., N., et al., 1999).

2.3. *Tubifex tubifex* (O.F. Müller, 1774)

2.3.1. Taxonomické členění

Říše: *Animalia* – živočichové
Podříše: *Eumetazoa*
Oddělení: *Protostomia* - prvoústí
Kmen: *Annelida* – kroužkovci
Třída: *Clitellata* - opaskovci
Podtřída: *Oligochaeta* - máloštětinatci
Řád: *Tubificida*
Čeleď: *Tubificidea* - nitěnkovití
Rod: *Tubifex* - nitěnka
Druh: *Tubifex tubifex* – nitěnka obecná

Vnitřní členění kmene kroužkovců (*Annelida*) není zcela jasné. Pomocí ostatních taxonů máloštětinatců bylo prokázáno, že se označení *Clitellata* a *Oligochaeta* staly synonymy. Přechodně byl tedy zaveden termín *oligochateous Clitellata* (Erséus, C., Gustavsson, L., 2002; Erséus, C., 2005).

2.3.2. Stavba těla

U kroužkovců je vytvořena tělní dutina *coelom*. Skládá se ze dvou váčků, které pravidelně vyplňují všechny články těla. Celé jejich tělo je složeno z homonomních článků, kromě prvního a posledního, které se odlišují. Tělo pokrývají chitinózní štětiny, které jsou na každém článku ve svazečcích po čtyřech. Svaly umožňující zatažení a vytažení štětiny jsou připojeny na bázi každé z nich. Svalovina dvojího typu – okružní a longitudinální. Pohybují se peristaltickými stahy podkožní svaloviny, pohybu taktéž napomáhají i štětiny (Lang, J., et al., 1971).

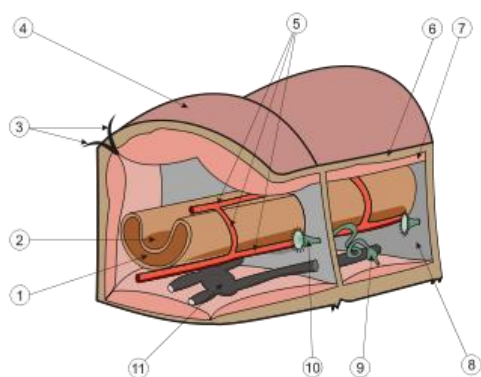
Trávicí soustava se skládá z úst, ústní dutiny, hltanu, jícnu a střeva. Jícen tvoří svalnatý žaludek, který rozemílá částice potravy. Ve stěně jícnu

se nachází vápenaté žlázy produkující uhličitan vápenatý, který se ale na trávení nepodílí. Střevo se táhne několika posledními tělními články, produkuje trávicí enzymy a absorbuje živiny. Uvnitř něj se nachází střevní řasa (typhlosolis), která zvětšuje povrch vstřebávání. Střevo obklopují cholagogenní buňky, které rozkládají toxiny, syntetizují a ukládají glukogen a syntetizují hemoglobin. Řitní otvor mají v posledním článku.

Pro vylučovací soustavu jsou typické *metanefridia* v každém segmentu. Jejich kanálek vždy přechází do následujícího článku a ústí zde na povrch.

Oběhovou soustavu tvoří dvě hlavní cévy - hřbetní a břišní. Od těchto dvou cév se oddělují kapiláry směřující k jednotlivým orgánům. Krev je poháněna dopředu pulzující hřbetní cévou. Kolem trávicí trubice v přední části těla je několik příčných komisur, sloužící jako pomocná srdce.

Nervová soustava je tzv. žebříčkovitá. Tvoří ji nadhltnová zauzlina (mozek), dva nervové provazce – podélně spojená ganglia, v každém tělním článku ještě spojená příčně. Mezi smyslové orgány patří fotoreceptory rozptýlené v pokožce, smyslové brvy a smyslové bradavky ve třech kruzích okolo každého článku.



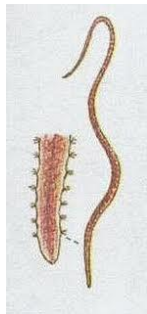
Obr. 5: Průřez nitěnkou

(<http://cs.wikipedia.org/wiki/M%C3%A1lo%C5%A1t%C4%9Btinatci>)

1	střevo	7	podélná svalovina
2	typhlosolis	8	septum
3	štetinky	9	sběrný kanálek
4	kutikula	10	metanefridia
5	krevní oběh	11	nervová páska
6	příčná svalovina		

K rozmnožování dochází přibližně dvakrát do roka. Tito živočichové jsou hermafroditi s genitálními segmenty v přední části těla. Zduřelá pokožka

v oblasti genitálních otvorů obsahující četné žlázy se nazývá opasek (*clitellum*), většinou ho tvoří dva segmenty. Žlázy opasku produkují hlen ke kopulaci (častěji u suchozemských druhů), také albumin a vytváří stěnu kokonu, ve kterém jsou uložena vajíčka. Vývoj oplozeného vajíčka v kokonu u čeledi *Tubificidae* trvá asi 20 dnů. Nitěnky kokon volně odkládají na dno. Kokony lze rozlišit dle jejich charakteristického tvaru pro jednotlivé druhy. Dva jedinci se k době spojí břišní stranou a to tak, že jedna nitěnka má u své hlavové části část zadní nitěnky druhé. Oba jedinci si při tomto propojení předávají spermatophory – shluky spermií s obalovou vrstvou. Podle přítomných spermatophorů se také určuje pohlavní zralost. Kromě tohoto znaku lze poznat mladšího jedince také podle nižšího počtu štětín. Přesto Kennedy (1933) zjistil, že žádným způsobem nelze spolehlivě určit skutečné stáří nitěnky, protože po rozmnožování dochází k úplné resorpci pohlavního aparátu. Kromě pohlavního rozmnožování dochází také k rozmnožování nepohlavnímu. Buď dochází k regeneraci chybějící části těla až oddělení dceřinných jedinců – architomie. Nebo regeneraci předchází oddělení jednotlivých částí těla – paratomie (Lellák, J., 1982; Buchar, J., et al., 1995).



Obr. 6: Detail uspořádání štětín

(http://www.guh.cz/edu/bi/biologie_bezobratli/html07/foto_003.html)

2.3.3. Dýchání a způsob potravy

Pouhým lidským okem lze rozpoznat, že nitěnce nechybí ani hemoglobin rozpuštěný v plazmě (je červeně zabarvená), který slouží k dýchání. Dýchá ale také i prostou kožní difuzí. Žije i za velmi nízkých koncentrací kyslíku, v této situaci množství hemoglobinu roste. Nitěnka je schopna desítky dní přežívat bez přístupu kyslíku, za nižších teplot vydrží bez kyslíku ještě déle. Jako zdroj energie je v těchto podmínkách využíván glykogen. Podíl glykolýzy

v metabolismu se může zvýšit 3 - 4×. Hlavovým koncem se zavrtá ve dně a zadní část těla vysune do vody. Vlnivými pohyby zadní části těla zvyšuje přísun kyslíku. Jednak zvyšuje plochu kontaktu těla s kyslíkem a jednak k tělu přichází voda bohatší na kyslík - dle pokusů Alsterberga (1922).

Živí se detritem a nespotřebovanými zbytky potravy nebo mikroorganismy. Potravu nalepují na vysunující se hltan (mikrofagie). Nitěnky jsou také významnou složkou potravy ryb, larev, vážek a dalších vodních živočichů. *Tubifex tubifex* je živočichem kosmopolitním. Nejhojněji se objevují v organicky znečištěných a hnilých mělkých vodách, ale i na dně hlubokých jezer, v povrchových vrstvách dna. Vyskytují se i v čistírnách odpadních vod. U *Tubifex tubifex* je známa encystace – za nepříznivých podmínek vytvoří na povrchu těla hlenovitý obal, který ztuhne (Lellák, J., et al., 1992).

2.3.4. Biologie a vztah k toxicitě

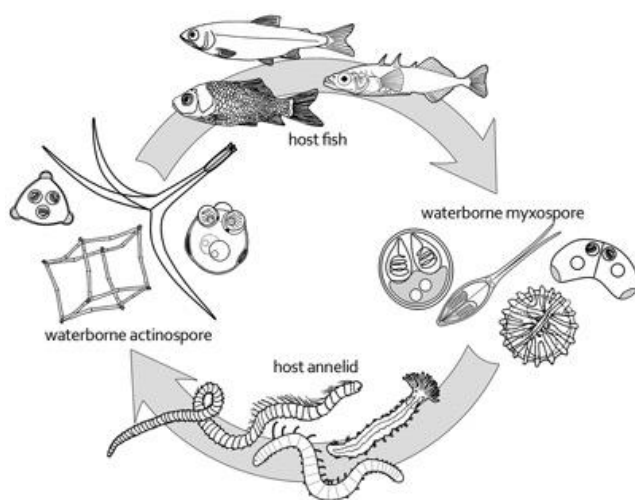
Nitěnka je díky svému způsobu života vystavena vlivu látek škodlivých pro životní prostředí. Nacházejí se ve vodě i sedimentu, (Giere, O., 1993) do kterého se nitěnka zahrabává přední částí těla. Máloštetinatec *Tubifex tubifex* je používán jako standardní model k ekotoxikologickým experimentům právě díky jeho schopnostem přežít i v extrémních podmínkách jako jsou těžce znečištěné a toxické ekosystémy a prostředí chudá na kyslík a to i v širokém rozpětí teplot od 0-30°C, (Walker, J., G., 1970). Kromě teploty je pro toxicitu neméně důležitá hodnota pH. Také jejich pozice ve středu potravního řetězce a snadné získání nitěnek k laboratorním účelům posloužilo k velmi častému využívání těchto bezobratlých živočichů (Khangarot, B., S., et al., 2003).

Často tedy bývají používány jako biomarkery znečištění vod a také k hodnocení toxicity těžkých kovů na životní prostředí, jako jsou například rtuť, kadmium, měď, chrom, olovo, arsen (Fargašová, A., 1994; Maestre, Z., et al., 2009), ale i uran. Ekosystém čistých vod se naneštěstí lidskou činností neustále zhoršuje. Těžké kovy se zadržují převážně v sedimentu na dně. Právě sediment ovlivňuje strukturu a funkčnost vodního ekosystému a tím i vodních živočichů. *Tubifex tubifex* mohou bioakumulovat kovy jak ze sedimentu, tak z vody.

Toto představuje risk také pro predátory, kteří se nitěnkami živí. Studie zabývající se toxicitou uranu, hodnotí vliv reálných koncentrací v sedimentu na *Tubifex tubifex*, který se nachází poblíž těžebních míst uranu. Po krátkodobé expozici uranu (asi 12 dní) se v laboratořích zjišťuje, kolik jedinců přežilo, jejich změny chování, malformace a změnu rozmnožování (Lagauzère, S., et al., 2009).

2.3.5. Nitěnka jako hostitel *Myxobolus cerebralis*

Kromě těchto pozitivních využití *Tubifex tubifex* může být nitěnka obecná i nebezpečná. Je prvním hostitelem myxosporogenního parazita *Myxobolus cerebralis*, který způsobuje vážné onemocnění lososovitých ryb. Onemocnění bylo poprvé popsáno minulé století v Německu na pstruzích. Projevuje se většinou kosterní deformací a neurologickou demencí ryb. Důsledkem je tedy místo přirozeného pohybu pohyb neohrabaný, spirálovitý, ryba se točí dokola, je pro ni těžší obstarat si potravu a zároveň se stává snadnější potravou pro okolní predátory. Nitěnka jako meziphostitel, pozře myxosporu a v jejím těle se dokončuje životní cyklus parazita. Do vody jsou uvolňovány sporocyty s triactinomyxony, které infikují ryby buď skrz epitel, nebo rovnou trávicím traktem. Po měsíci a půl se onemocnění začíná projevovat. Další spory jsou do vody uvolňovány po úmrtí nakažené ryby (Alexandr, J., D., 2010).



Obr. 7: Vývojový cyklus parazita *Myxobolus cerebralis*

(http://microbiology.science.oregonstate.edu/barthol_lab_atkinson)

2.4. Tetrahymena sp.

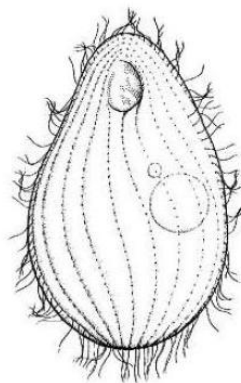
2.4.1. Taxonomické členění

Doména: *Eukaryota*
Říše: *Chromalveolata*
Podříše: *Alveolata*
Kmen: *Ciliophora*
Třída: *Oligohymenophorea*
Řád: *Hymenostomatida*
Čeleď: *Tetrahymenidae*
Rod: *Tetrahymena*
Druh: *Tetrahymena thermophila*

(Hausmann, K., et al., 2003)

2.4.2. Obecné poznatky o protozoích

Tetrahymena patří mezi prvoky. V roce 1899 byli prvoci rozčleněni podle způsobu pohybu na bičíkovce, výtrusovce, kořenonožce a nálevníky. Toto členění je dnes již zastaralé. Nyní se řadí, společně s autotrofními houbovitými organizmy, jednobuněčnými řasami a desítkami mnohobuněčných organismů, do několika velkých skupin s taxonomickou úrovní říše *Chromalveolata* (Cavalier-Smith, T., 2002).



Obr. 8: *Tetrahymena* (Lynn, D., H., 2003)

Stále víme pouze velmi málo o jejich geografickém výskytu. Nejčastěji se *Protozoa* nacházejí ve znečištěných vodách. Díky jejich relativně velké hojnosti a různorodosti jsou proto využívány jako indikátory organického a toxického znečištění. Podílejí se na samočisticích pochodech ve vodním prostředí. Jsou predátory jednobuněčných řas, bakterií a mikroskopických hub. V potravním řetězci hrají roli jak býložravců, tak i konzumentů rozkládajících se organismů. Mohou i parazitovat a žít se organismem svého hostitele.

Zatím je známo asi kolem 20 000 druhů prvoků žijících ve vodě a v půdě (všude, kde je vlhko). Ve vodě jsou hlavní složkou planktonu. Mohou přežívat i v hodně nepříznivých životních podmínkách díky tvorbě cyst. Cysta chrání protozoa v extrémních teplotách proti toxickým chemikáliím. A pokud se vyskytne nedostatek kyslíku, vlhkosti nebo potravy. Živiny získávají z rozkladu organické hmoty a mohou růst v aerobním i anaerobním prostředí. Jako například prvoci žijící ve střevě jiných živočichů (Hausmann, K., et al., 2003).

2.4.3. Stavba eukaryotické buňky

Eukaryotická buňka je vysoce organizovaná struktura skládající se z organel a ohraničená membránou. Každá tato organela má specializovanou funkci pro buněčný metabolismus.

Jádro obehnané membránou, kde je buněčná DNA organizovaná do chromozomů. Slouží tedy k rozmnožování a přenosu genetické informace. Probíhá u nich rozmnožování dvojího typu – pohlavní a nepohlavní tj. rozpad nebo dělení jádra (Nečas, O., et al., 2000; Helešicová, M., 2012).

Další organely slouží k získávání potravy, trávení, vylučování i k pohybu.

Buněčná stěna je součástí spousty eukaryotních buněk. Prvoci ale místo ní mají pelikulu, která tvoří proteinový kryt jednotlivých buněk. Často je tvořena schránka z plasmatické membrány.

Plasmatická membrána obklopuje buňku a slouží jako bariéra mezi vnějším a vnitřním prostředím. Látky vstupující a opouštějící buňku prostřednictvím plasmatické membrány používají prostou difuzi, osmózu nebo aktivní transport. Typ aktivního transportu je například endocytóza. Dělí se podle povahy částic na fagocytózu (pevné částice) a pinocytózu (tekuté částice). Odpadní produkty jsou z těla vylučovány exostózou (Helešicová, M., 2012).

Eukaryotická cytoplasma obsahuje cytoskelet, systém bílkovin. Je tvořen mikrofilamenty a mikrotubuly. V buňce tvoří svazky schopné se natahovat a zkracovat, cytoplazma se tedy v buňce pohybuje. Mikrofilamenty a mikrotubuly slouží také k tvorbě mitotického dělicího vřeténka.

Endoplasmatické retikulum slouží k tvorbě bílkovin, cukrů a tuků. Tyto produkty jsou v transportních váčcích dopravovány do Golgiho komplexu. Zde probíhají další biochemické reakce. Také zde dochází k odstraňování metabolitů z buněčného těla.

Lysozomy jsou orgány vyskytující se pouze v živočišných buňkách uzpůsobené k trávení.

Mitochondrie se skládají z krist, jsou zodpovědné za tvorbu energie (produkce ATP) a za buněčné dýchání (Nečas, O., et al., 2000).

Pohybují se pomocí řasinek, bičíků (*flagellum*), panožek, améboidním přeléváním cytoplasmy nebo jsou specializovaní parazité. Také se mohou pohybovat pomocí proudění vody a vzduchu, tedy pasivně (<http://water.mecc.edu/courses/ENV108/lesson6b.htm>).

2.4.4. Fototoxicita a tetrahymena

Tetrahymena je používána jako alternativní model k hodnocení fototoxicity. Tyto metody nabyly důležitosti kvůli zmenšování ochranné vrstvy ozónu. Klasický test dráždivosti králičího oka nebo ozařování myšího ocasu

se setkávalo s velkou kritikou ochránců zvířat, proto se nyní přistupuje k alternativním testům, při kterých je vhodným organismem například právě zmíněná *Tetrahymena*. Studují se efekty UVB záření, poškození DNA, a schopnost obrany proti oxidativnímu stresu (Misra, R., B., et al., 1999).

2.4.5. Nemoci způsobené prvoky

Několik protozoí může být příčinou nemoci, nejčastěji přenášené infikovanou vodou. Nejčastějšími patogeny jsou například *Entamoeba*, *Giardina*, *Toxoplasma*. Všechny tyto druhy jsou schopné tvořit cysty nebo projektivní obaly, které jim umožní nějaký čas přežít i mimo tělo hostitele. Cysty chrání protozoa také proti chlóru, proto ani desinfekce vody chlórem nákaze nezabrání. Obvykle se voda vyčistí jen pomocí filtrace (Fajfr, M., et al., 2010).

Jediný známý patogenní nálevník je zatím *Balantidium coli*, také se jedná o jediného nálevníka, který může nakazit i člověka. Toto onemocnění je jen málo časté a nazývá se balantidióza. K nákaze dochází vodou kontaminovanou výkaly nakažených organismů a uvnitř těla se pak dále roznáší krví. Největší počet onemocnění balantidiózou je v tropech. Projevuje se krvavými hlenovými průjmy, vysokými teplotami, nechutenstvím, snížením tělesné váhy a může dojít až k rozsáhlému poškození jater. Diagnostika se provádí pomocí mikroskopu – ve stolici jsou zřetelně viditelní nálevníci nebo jejich cysty. Léčí se metronidazolem případně i tetracyklinem (Schuster, F., L., 2008).

Ne vždy jsou však prvoci v organismu škodliví. Například termity mají ve svých střevech bičíkovce a přežvýkavci ve svém bachoru obsahují nálevníky, kteří svým hostitelům pomáhají v trávení (Čepička, I., et al., 2007).

2.4.6. Léčiva používaná proti protozoárním infekcím

Protozoa patří mezi nejčastější původce onemocnění především v tropických oblastech. Kvůli rozšířenému cestovnímu ruchu musí i zdejší lékař brát ohled na výskyt protozoárních infekcí v našich zeměpisných šířkách. Jednotlivé choroby jsou různě závažné, některé mohou probíhat i letálně.

Existuje řada velmi účinných chemoterapeutik, ale protozoa mají velkou schopnost resistance, což farmakoterapii hodně znesnadňuje (Lüllmann, H., et al., 2004).

Entamoeba histolytica se může v organismu vyskytovat ve dvou formách – *magna* a *minuta*. Lék první volby při jaterních abscesech a dysenterii je metronidazol. Při intestinálních formách je možné terapii podpořit podáním halogenovaných chinolinů, které mají amébocidní účinky. Pokud tato terapie selže, musí se zahájit léčba chlorochinem, který působí proti vegetativním formám.

Infekce vyvolané *Giardia lamblia* je rozšířena po celém světě, zdomácněla i v mírných pásech a vyvolává jen málo závažné potíže. *Lamblie* jsou opatřené bičíkem, žijí ve střevě a lze je prokázat ve stolici. Infekce se léčí podáním metronidazolu, nimorazolu nebo mepakrinu.

Chemoterapeutika proti toxoplasmóze působí pouze na extracelulární formy. Příznivé výsledky se dosahují pomocí pyrimethaminu s klindamycinem. Pyrimethamin jako antagonist kyseliny listové se nesmí podávat v prvních pěti měsících těhotenství, v tomto období se doporučují alternativní léčiva – deriváty erytromycinu (Lüllmann, H., et al., 2004).

2.4.7. Metanogenní *symbionti* anaerobních prvoků

Zajímavé je, že i prvoky (v tomto případě nálevníky), kteří parazitují na jiných organismech, mohou osídlovat vnitrobuněční symbionti. Mohou se vyskytovat jako paraziti, komenzálové nebo mutualisti, vždy jde o prokaryotické organismy mnoha druhů. O vzájemných metabolických interakcích anaerobního nálevníka s jeho symbionty je zatím pouze velmi málo informací. Jedna z nejvýznamnějších skupin vnitrobuněčných symbiontů anaerobních nálevníků jsou metanogenní archebakterie. Existuje názor, že jejich vzájemná symbióza funguje od počátku evoluce nálevníků (Van Hoek, A., et al., 2000).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3. 1. Metodika testu

Experimentální metodika screeningových testů používaná na katedře Farmaceutické botaniky a ekologie slouží k ověřování fotosezibilizujících vlastností zkoumaných toxinů. V této práci jsou používány dva typy testů na dvou typech organismů: *Tubifex tubifex* Müll. a *Tetrahymena thermophila* (*T. pyriformis*).

3.1.1. Testování na organismu *Tubifex tubifex* Müll.

3.1.1.1. Design testu

K provedení testu s nitěnkami se používá miniaturizované uspořádání 24jamkových makrotitračních destiček, dle nejnovějších trendů v ekotoxikologii.

Při každém pokusu je třeba vedle testovaných fotosenzibilizačních látek zkoušet ještě standardní látku, díky které zjistíme citlivost nitěnky a poznáme, zda test probíhá podle předepsaných podmínek. K tomuto účelu byl jako standard použit MnCl_2 .

3.1.1.2. Preliminary test

U každé zkoušené látky je třeba nejprve stanovit citlivost organismu k danému toxinu. Předběžné testy tedy mají za úkol najít nejvhodnější rozsah koncentrací tak, aby nejvyšší z nich měla vliv na všechny použité organismy a koncentrace nejnižší by neměla mít vliv na žádný z organismů.

3.1.1.3. Vlastní test

První bod každého vlastního testování je provedení testu se standardním toxinem (MnCl_2). Organismy v šesti různých koncentracích standardu a ve třech

paralelních měřeních jsou po dobu jedné hodiny ozařovány. Po skončení stanovené doby se vyhodnocuje mortalita.

Na základě pozitivních výsledků předběžného testu se může v experimentu pokračovat. Připraví se koncentrační řada postupným ředěním výchozího, předem spočítaného, naváženého a rozpuštěného koncentráту látky.

Každá z 24 jamek makrotitrační destičky se naplní nitěnkami – 1 jamka = 6 jedinců. Před přidáním testované látky je třeba zkontrolovat pod stereomikroskopem, zda jsou nitěnky nepoškozené a vitální.

Celá první řada makrotitrační destičky je negativní kontrolou pokusu – nepřidávají se fotosenzibilizační látky, pouze deionizovaná voda a na konci zkoušení by měly všechny nitěnky v této řadě být živé a nepoškozeny. Zároveň se připravuje ještě jedna destička totožná s předchozí – šest různých koncentrací testovaných fototoxinů ve třech paralelních stanoveních, včetně kontroly. Tato destička slouží k temnostní kontrole – vliv fototoxinů bez ozařování.

Nejprve se naplněná destička připravená k pokusu na 20 minut sytí v inkubátoru, a teprve poté na nitěnky v průběhu zvolené doby ozařování (0,5h; 1h) působí UV záření. Po ukončení doby ozařování se test hned vyhodnocuje pod stereomikroskopem, včetně destičky neozářené.

3.1.1.4. Hodnocení testu

V našich testech byla hodnocena mortalita a poškození *Tubifex tubifex*, a to zároveň destičky ozařované i té, která UV záření vystavena nebyla (temnostní kontrola). Zmíněné parametry se hodnotí ihned po skončení stanovené doby ozařování. Z výsledků byly pomocí statistického programu vypočítány hodnoty LC₅₀.

3.1.2. Vícegenerační test s *Tetrahymena thermophila*

3.1.2.1. Design testu

Pokus se provádí v jednorázové umělohmotné spektrofotometrické 96jamkové destičce s víkem, o objemu jamek 350 µl. Výhodná je také vlastnost destičky, která umožňuje bezprostřední měření optické hustoty naplněných jamek v readeru.

Sloučenina dichroman draselný $K_2Cr_2O_7$ v experimentu sloužil k ověření standardnosti testovaných organismů.

3.1.2.2. Preliminary test

Stejně jako v předchozím testu s nitěnkou je i zde nutné stanovit nejvhodnější koncentraci testované látky, na kterou je organismus nejcitlivější.

3.1.2.3. Vlastní test

Zároveň s každým novým testem byla za stejných podmínek jako v experimentu ověřena standardnost tetrahymeny. Jako standart byl použit $K_2Cr_2O_7$, jak je již výše zmíněno.

Na analytických vahách byly naváženy testované látky. Dále byly pomocí deionizované vody připraveny koncentrační řady roztoků koeficientem ředění 2. Vzniklo tak 10 vzorků zkoumané látky s postupně se snižující koncentrací.

Do destičky bylo v laminárním boxu dávkováno:

1. řada 150µl peptonu - vysoce výživné medium podporující růst prvoků
2. řada 100µl peptonu a 50µl testované látky – přidávána postupně od nejnižší koncentrace
3. řada 100µl peptonu a 50µl suspenze s *Tetrahymena thermophila*
4. řada 50µl peptonu, 50µl testované látky, 50µl suspenze s předem naočkovanými prvoky

5. a 6. řada tvořily paralelní stanovení s řadou 4.

Celkově se v destičce zaplnilo šest řad po deseti sloupcích. První tři řady jsou kontrolou celého pokusu a mimo jiné slouží také k výpočtu procentuální inhibice prvoků.

K provedení jednoho testu bylo nutné výše popsaným způsobem naplnit dvě spektrofotometrické destičky naprosto stejně. Jedna z nich byla vystavena UV záření a druhá z nich sloužila jako temnostní kontrola.

Po naplnění obou destiček se ihned pomocí readeru změřila optická hustota při zvolené vlnové délce (492nm). Jedna z destiček byla ozařována pod UV lampou (365nm a hustotě zářivého toku $0,3 \text{ mW.cm}^{-2}$) po dobu 1 hodiny, poté umístěna do inkubátoru do tmy při 25°C. Druhá sloužila jako temnostní kontrola a byla umístěna po celých 24 hodin v inkubátoru za tmy při teplotě 25 °C. Po ukončení experimentu (po 24 hodinách) byly opět odečteny výsledky na readeru při zvolené vlnové délce.

3.1.2.4. Hodnocení testu

Z naměřených hodnot se vypočítala procenta inhibice tetrahymen podle vzorce:

$$\% \text{ inhibice} = \left(1 - \frac{\Delta OD(t)}{\Delta OD(k)} \right) \times 100$$

$\Delta OD(t)$ = rozdíl optické hustoty v čase T0 a T24 pro každou koncentraci

$\Delta OD(k)$ = rozdíl optické hustoty v kontrole

Výsledky byly zpracovávány jak u prvoků, na které působila zkoušená látka společně s UV zářením, tak i na které působila pouze testovaná látka. Každý experiment byl nejméně třikrát opakován, aby byla ověřena správnost průběhu pokusu. Ze získaných výsledků byla pomocí statistického software GraphPad Prism 5.04 nelineární regresí získána hodnota $24hEC_{50}$ s 95% intervaly spolehlivosti.

3.2. Princip výpočtu fotoiritačního faktoru

Výpočet fotoiritačního faktoru (PIF) jsme v této diplomové práci použili pro srovnání fotosenzibilizačních vlastností testovaných látek. Prvotně je PIF určen pro vyhodnocení výsledků testu fototoxicity 3T3 NRU *in vitro*. Tento test zjišťuje, zda daná látka představuje nebezpečí ve spojení s expozicí viditelného a ultrafialového záření. Lze jím také zjistit, která látka je toxická ve spojení se světlem *in vivo* a která po topické aplikaci na pokožku. Není však možné tímto testem určit další nepříznivé účinky, jako je fotoalergie nebo fotokarcenogenita.

Vypočítá se podle vzorce

$$PIF = \frac{EC50 (-UV)}{EC50 (+UV)}$$

pokud je hodnota **PIF < 1**, látka nepředpovídá žádný fototoxický potenciál (reakce organismu na látku je stejná jak při ozáření, tak i v temnostní kontrole nebo může být dokonce fotoprotektivní),

pokud je hodnota **PIF > 1** a zároveň **PIF < 5**, látka vykazuje středně silný fototoxický potenciál,

pokud je hodnota **PIF ≥ 5**, látka předpovídá silný fototoxický potenciál (http://www.eurochem.cz/index/toxi/443_a2_41.htm, staženo 20. 7. 2012).

3. 3. Chemikálie, přístroje a testované organismy

3.3.1. Chemikálie

Chlorid manganatý $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ p.a. Fluka

Dichroman draselný $K_2Cr_2O_7$

Bengálská červeň, Fluka

Hypericin (extrakt získaný na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie)

Chloracetamid, Sigma-Aldrich

Phenmedipham, p.a. Sigma-Aldrich

Proteose-Pepton, Fluka

Deionizovaná voda

3.3.2. Přístroje

Předvážky Kern 440-47N

Analytické váhy Kern abj

Oxymetr Oxi340i

Termostat VTB Binder

pHmetr pH/Cond 340

ultrazvuková lázeň Bandelin

UV lampa DDHN 16 330 (345/245nm)

Stereomikroskop Leica EZ4D

Laminární box AURA 2000 M.A.C.

Reader Anthos 2010

3.3.3. Testované organismy

3.3.3.1. *Tubifex tubifex* Müll.

Nitěnka obecná je chována v akváriu s vrstvou vody 8 cm a vrstvou písku 6 cm
24 hodin denně je akvárium provzdušňováno, teplota $20 \pm 2^\circ\text{C}$

Světelný režim v hodinách 10:14 / den:noc

1 den před provedením testu se nitěnky entomologickou pinzetou přendají ze svého přirozeného prostředí do čisté deionizované vody a nechají se alespoň 24 hodin v inkubátoru za tmy.



Obr. 9: Nitěnky připravené k experimentu

(<http://www.aquariummidaschober.cz/?page=detail&itemid=308>)

3.3.3.2. *Tetrahymena thermophila*

Tetrahymena thermophila je uchovávána v plastových kultivačních zkumavkách. 24 hodin před pokusem jsou tetrahymeny přeočkovány do plastových zkumavek, odkud se již mohou pipetovat do předem připravených destiček.



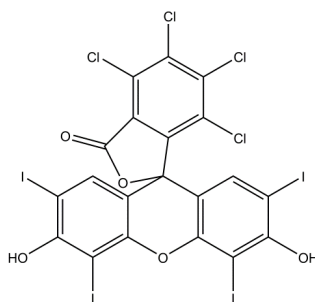
Obr. 10: *Tetrahymena* pod mikroskopem

(<http://www.pirx.com/droplet/gallery/tetrahymena.html>)

3.4. Použité látky

3.4.1. Bengálská červeně

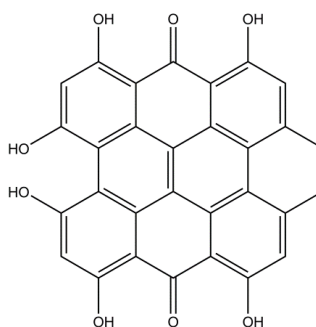
Organické opticky inaktivní barvivo obsahující směs halogenovaných fluoresceinů. 1% roztok sodné soli bengálské červeně se používá v očních kapkách. Slouží k diagnóze keratokojunktivitise sicca, barví nekrotické buňky a hlen v ulcerózních změnách rohovky. V klinických studiích se nyní testuje bengálská červeně pro použití k léčbě rakoviny (melanomy a rakoviny prsu) a k léčbě ekzémů a psoriázy. V chemických a biologických oborech je užívána k tvorbě signetového kyslíku a také jako insekticid (Kim, Y., et al., 2001; Koevary, S., B., 2012).



Obr. 11: Vzorec bengálské červeně

3.4.2. Hypericin

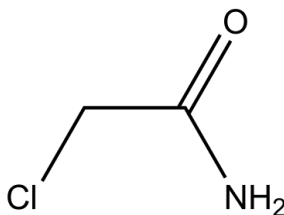
Extrakt z třezalky tečkované obsahuje celou řadu látek, z nichž neúčinnější jsou hyperforin a hypericin. Ovlivňují hladinu noradrenalinu, dopaminu a serotoninu v mozku, jsou tedy zodpovědné za regulaci nálady. Hypericin se také používá ve fotodynamické terapii a má antimikrobiální a virostatické účinky (Vacek, J., et al., 2007). Více viz kapitola 2.2.4.1.



Obr. 12: Vzorec hypericinu

3.4.3. Chloracetamid

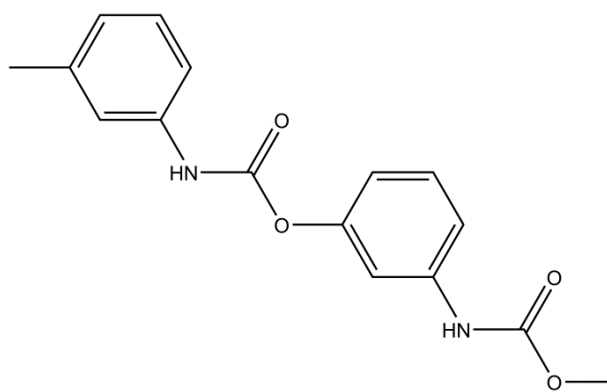
Organická sloučenina tvořící bezbarvé až žluté krystalky s charakteristickým zápachem, mírně rozpustné ve vodě. Při požití je toxický, dráždí oči i kůži. Opakovaný nebo dlouhý kontakt způsobuje zvýšenou citlivost kůže. Bylo dokázáno, že snižuje plodnost laboratorních zvířat. Je nebezpečný pro vodní organismy. Používá se jako pesticid, konzervant v barvách, detergent, také v textilním průmyslu a podobných oborech (<http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0640.htm>).



Obr. 13: Vzorec chloracetamidu

3.4.4. Phenmedipham

Jde o bis-karbamátový herbicid (pod obchodním názvem Betanal) účinný zejména proti jednoletým dvouděložným plevelům. Hubí pouze vzešlé plevely, je inhibitorem fotosyntézy. Akutní toxicita je mírná, může však kontaminovat vodu a způsobit intoxikaci zooplanktonu (*Daphnia magna*) a mortalitu vodních rostlin a ryb. Po kontaktu člověka s touto chemikálií může nastat, zejména po vystavení světlu, podráždění kůže až rozsáhlé fotodermatitidy okolo místa kontaktu (http://www.pesticideinfo.org/List_AquireAll.jsp?Rec_Id=PC35159; Koch, P., et al., 1989).



Obr. 14: Vzorec phenmediphamu

4. VÝSLEDKY

4.1. Test fototoxicity na *Tubifex Tubifex*

Standardní látkou, která slouží k ověření citlivosti nitěnky je chlorid manganatý MnCl_2 – pomocí statistického programu GraphPad Prism 5.04 Project byla stanovena hodnota střední letální koncentrace: $1\text{hLC}_{50} = 68,040$ mmol/l (29,950-36,740 mmol/l).

Všechny testované látky v jednotlivých koncentracích včetně procent mortality jsou uvedeny v tabulkách 1, 2 a 3. Součástí hodnot LC_{50} jsou 95% konfidenční intervaly spolehlivosti.

Tabulka 1: Reálné koncentrace testovaných látek v roztocích

Roztok č.	Reálná koncentrace (mmol/l)			
	Bengálská červeň	Hypericin v extraktu	Chloracetamid	Phenmedipham
1	2,500	4,213	2,083	2,500
2	1,250	2,106	1,042	1,250
3	0,625	1,053	0,521	0,625
4	0,313	0,527	0,260	0,313
5	0,156	0,263	0,130	0,156
6	0,078	0,132	0,065	0,078

pozn.: obsah hypericinu v extraktu je podle lékopisu minimálně 85%,
uvedená koncentrace je přepočítaná na hypericin obsažený v extraktu

**Tabulka 2: Procenta mortality nitěnek v reálných koncentracích
a doba ozařování – Bengálská červeň**

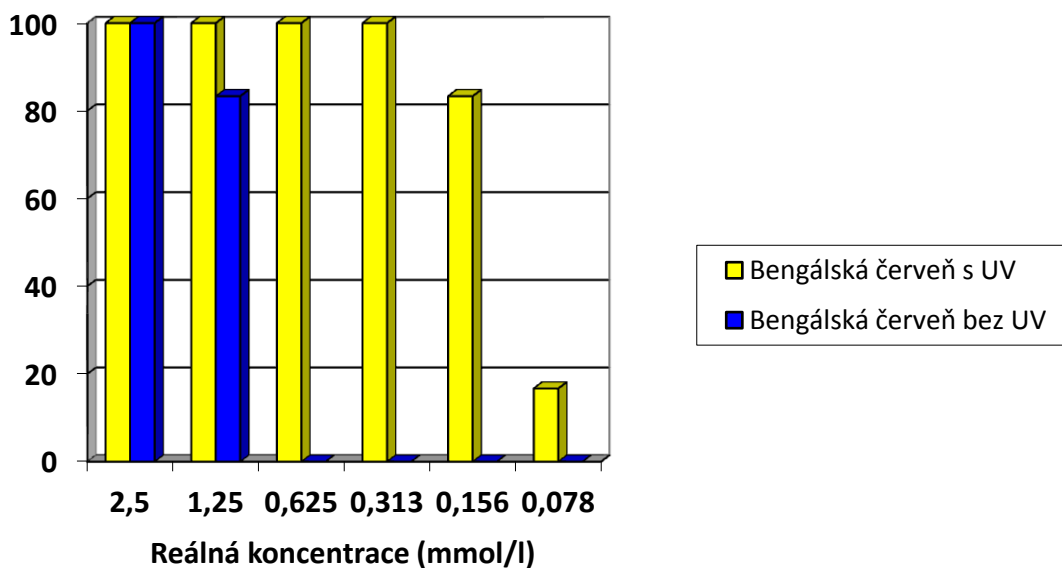
	Doba ozařování (h)					
Koncentrace (mmol/l)	0,5	1	2	3	4	5
2,500	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
1,250	16,67	66,67	100,00	100,00	100,00	100,00
0,625	0	0	33,33	100,00	100,00	100,00
0,313	0	0	0	66,67	83,33	100,00
0,156	0	0	0	33,33	50	83,33
0,078	0	0	0	0	0	16,67

Byla stanovena hodnota střední letální koncentrace: $1hLC_{50} = 1,230$ mmol/l.

**Tabulka 3: Procenta mortality nitěnek v reálných koncentracích a čas
působení látky bez UV záření – Bengálská červeň**

	Čas působení (h)					
Koncentrace (mmol/l)	0,5	1	2	3	4	5
2,500	33,33	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
1,250	0	16,67	66,67	66,67	83,33	83,33
0,625	0	0	0	0	0	0
0,313	0	0	0	0	0	0
0,156	0	0	0	0	0	0
0,078	0	0	0	0	0	0

Byla stanovena hodnota střední letální koncentrace: $1hLC_{50} = 1,310$ mmol/l.



Obr. 15: Graf srovnání účinků bengálské červeně na nitěnky s UV zářením a bez UV záření

Hypericin – všechny nitěnky v experimentu (ozařované i v temnostních kontrolách) byly ve všech zvolených časech ozařování i po 24 hodinách od počátku experimentu nepoškozené a živé. Pravděpodobně lze říci, že zvolená koncentrace hypericinu byla příliš malá.

Chloracetamid – po 3 hodinách způsoboval pouze natažení nitěnek jak u temnostních kontrol, tak u ozařovaných jedinců. Po 24 hodinách od počátku pokusu při ozařování 4h byla zaznamenána 100% mortalita nitěnek i jejich současné poškození ve všech testovaných koncentracích. V temnostních kontrolách byla 100% mortalita u prvních pěti koncentrací, poslední vykazovala v průměru 12% mortalitu. Poškození bylo pozorováno ve všech testovaných koncentracích.

Phenmedipham – neměl v použité koncentraci na nitěnky žádný efekt (nezpůsoboval poškození ani mortalitu) ve všech dobách ozařování i v temnostních kontrolách. Po 24 h od počátku experimentu nevykazoval žádné změny.

4.2. Vícegenerační test s *Tetrahymena thermophila*

Standardní toxin dichroman draselný $K_2Cr_2O_7$ – statistickým programem byla stanovena hodnota střední efektivní koncentrace: $24hEC_{50} = 0,066$ mmol/l (0,046-0,094 mmol/l).

Testované látky ve všech zkoušených koncentracích včetně procent inhibice jsou znázorněny v následujících tabulkách. Hodnoty EC_{50} jsou doplněny o 95% konfidenční intervaly spolehlivosti.

Tabulka 4: Reálné koncentrace testovaných látek v roztocích

Roztok č.	Reálná koncentrace (mmol/l)			
	Bengálská červeň	Hypericin v extraktu	Chloracetamid	Phenmedipham
1	0,625	8,425	2,083	5,528
2	0,313	4,213	1,042	2,784
3	0,156	2,106	0,521	1,382
4	0,078	1,053	0,260	0,691
5	0,039	0,527	0,130	0,346
6	0,019	0,263	0,065	0,173
7	0,010	0,132	0,033	0,086
8	0,005	0,066	0,016	0,043
9	0,002	0,033	0,008	0,022
10	0,001	0,017	0,004	0,011

pozn.: obsah hypericinu v extraktu je podle lékopisu minimálně 85%,
uvedená koncentrace je přepočítaná na hypericin obsažený v extraktu

Tabulka 5: Bengálská červeň s ozářením – průměrná inhibice (%)
tetrahymen v jednotlivých koncentracích

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
100,00	100,00	100,00	91,97	84,38	68,75	53,12	45,31	37,50	21,87

pozn.: Čísla 1-10 značí reálné koncentrace roztoků znázorněné v tabulce č. 4.

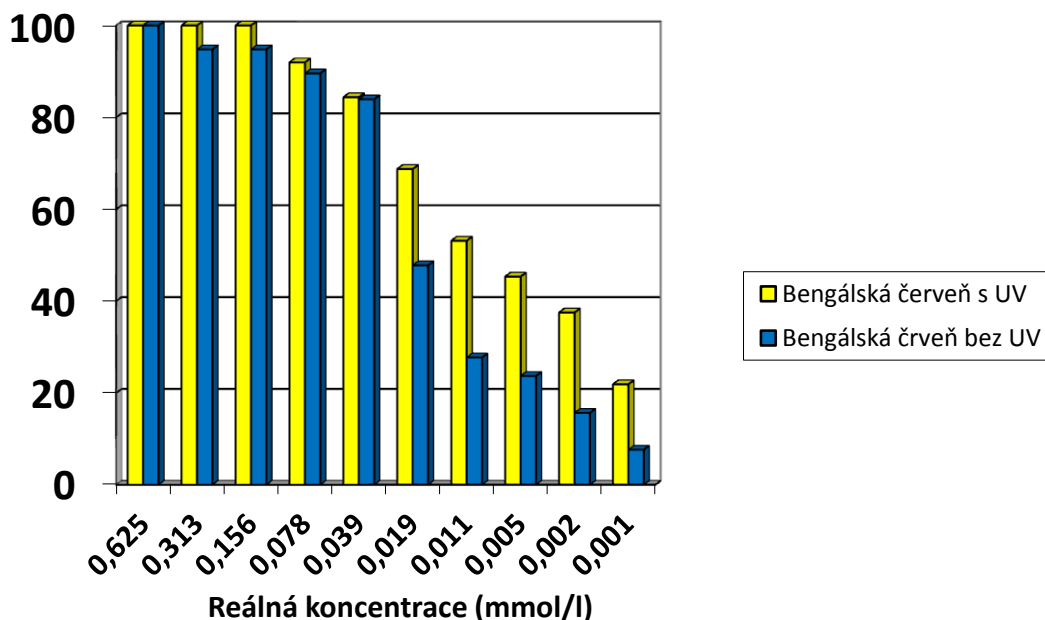
To samé platí pro tabulky č. 6 – 12.

Hodnota střední efektivní koncentrace je: $24hEC_{50} = 0,003 \text{ mmol/l}$ (0,003-0,005mmol/l).

Tabulka 6: Bengálská červeň bez ozáření – průměrná inhibice (%)
tetrahymen v jednotlivých koncentracích

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
100,00	94,79	94,79	89,58	83,94	47,79	27,71	23,63	15,66	7,63

Hodnota střední efektivní koncentrace je: $24hEC_{50} = 0,017 \text{ mmol/l}$ (0,013-0,019mmol/l).



Obr. 16: Graf srovnání účinků bengálské červeně na tetrahymeny s UV zářením a bez UV záření

**Tabulka 7: Hypericin s ozářením – průměrná inhibice (%) tetrahymen
v jednotlivých koncentracích**

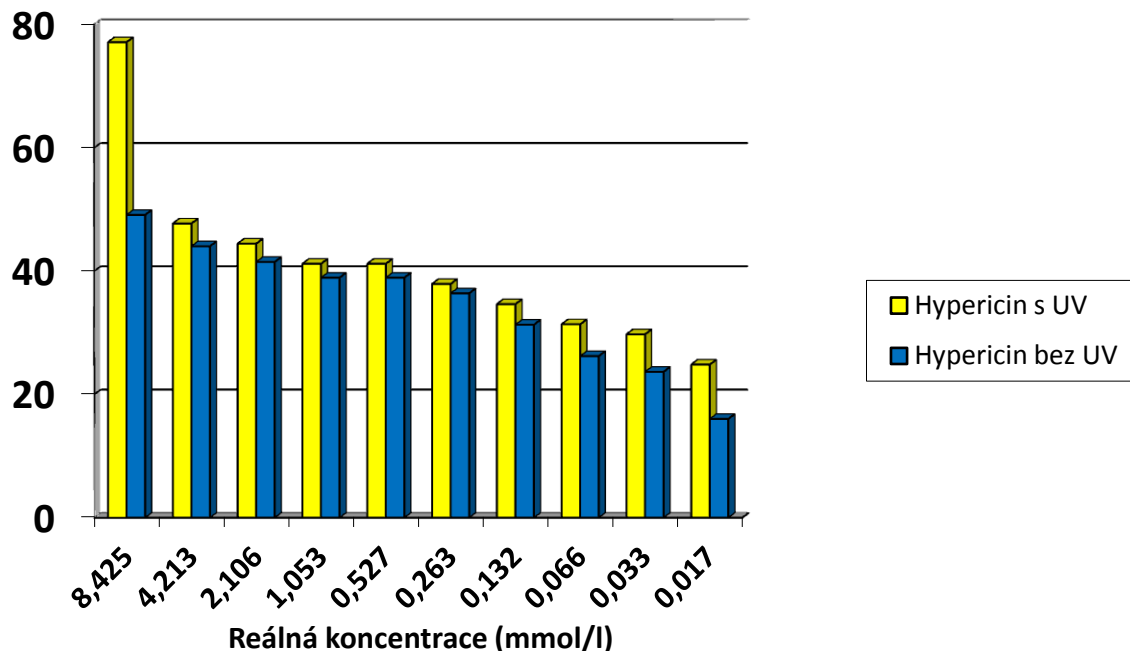
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
77,12	47,71	44,44	41,18	41,18	37,91	34,64	31,37	29,74	24,84

Hodnota střední efektivní koncentrace je: $24hEC_{50} = 2,022 \text{ mmol/l}$ (1,040-3,901 mmol/l).

**Tabulka 8: Hypericin bez ozáření – průměrná inhibice (%) tetrahymen
v jednotlivých koncentracích**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
49,11	44,02	41,48	38,93	38,93	36,39	31,30	26,21	23,66	16,03

Hodnota střední efektivní koncentrace je: $24hEC_{50} = 10,269 \text{ mmol/l}$ (6,437-16,402 mmol/l).



*Obr. 17: Graf srovnání účinků hypericinu na tetrahymeny s UV zářením
a bez UV záření*

Tabulka 9: Chloracetamid s ozářením – průměrná inhibice (%) tetrahymen v jednotlivých koncentracích

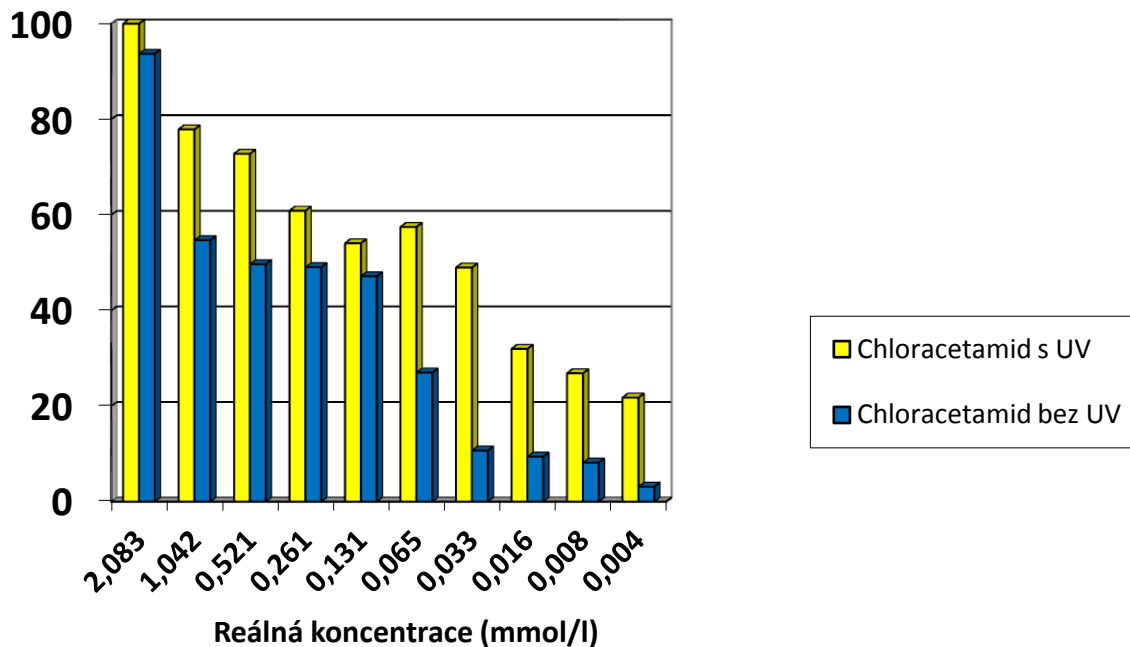
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
100,00	77,89	72,79	60,88	54,08	57,48	48,98	31,97	26,87	21,77

Hodnota střední efektivní koncentrace je: $24hEC_{50} = 0,254 \text{ mmol/l}$ (0,215-0,291 mmol/l).

Tabulka 10: Chloracetamid bez ozáření – průměrná inhibice (%) tetrahymen v jednotlivých koncentracích

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
93,71	54,72	49,69	49,06	47,17	27,04	10,67	9,43	8,18	3,14

Hodnota střední efektivní koncentrace je: $24hEC_{50} = 0,696 \text{ mmol/l}$ (0,593-0,817 mmol/l).



Obr. 18: Graf srovnání účinků chloracetamidu na tetrahymeny s UV zářením a bez UV záření

**Tabulka 11: Phenmedipham s ozářením – průměrná inhibice (%)
tetrahymen v jednotlivých koncentracích**

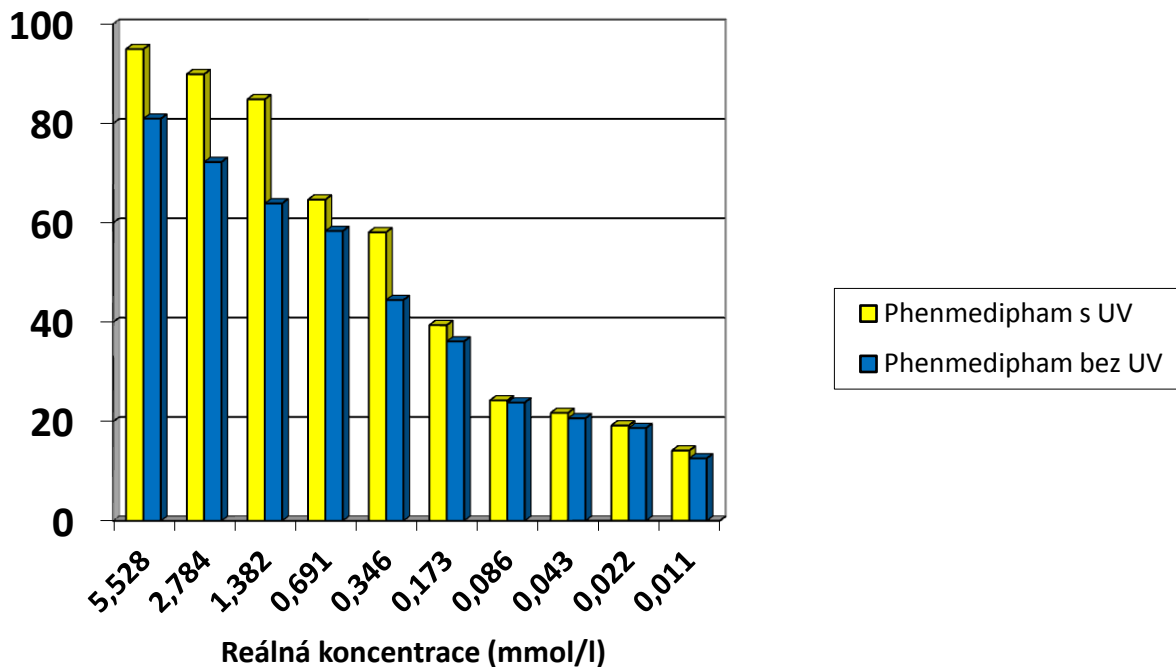
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
94,95	89,90	84,85	64,65	58,08	39,39	24,24	21,72	19,19	14,14

Hodnota střední efektivní koncentrace je: $24hEC_{50} = 0,259 \text{ mmol/l}$ (0,221-0,303 mmol/l).

**Tabulka 12: Phenmedipham bez ozáření – průměrná inhibice (%)
tetrahymen v jednotlivých koncentracích**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
80,95	72,22	63,89	58,33	44,44	36,11	23,81	20,63	18,67	12,57

Hodnota střední efektivní koncentrace je: $24hEC_{50} = 1,156 \text{ mmol/l}$ (0,586-2,311 mmol/l).



Obr. 19: Graf srovnání účinků phenmediphamu na tetrahymeny s UV zářením a bez UV záření

5. DISKUSE

Fototoxické a fotoalergické vlastnosti léčiv a ostatních látek je nutné zjišťovat a dále testovat hned z několika důvodů. Jedním z hlavních důvodů, je zvýšené nebezpečí popálení pokožky až karcinomu kůže, po prvním nebo opakovaném kontaktu (lokálním nebo celkovým) s fotosenzibilizační látkou a následné expozici viditelnému nebo ultrafialovému záření. Dospělá populace více užívá léky a kosmetické přípravky, ve kterých se zmiňované látky nacházejí, proto by u těchto osob měl být výskyt fotosenzitivních reakcí častější než u osob v mladším věku. Dalším z důvodů nutnosti testování je jejich využití v léčbě některých onemocnění, například ekzémů, psoriázy nebo dokonce i rakoviny prsu (Ditrichová, D., 2008; Lüllmann, H., et al., 2004).

Fotoreaktivní látky jsou studovány například testem fototoxicity 3T3 NRU *in vitro*. Slouží ke stanovení fototoxického potenciálu dané látky. Byl vypracován a používá se jako validní alternativa *in vitro* vůči používaným testům *in vivo*. Výsledky tohoto testu byly porovnávány s akutními účinky fototoxicity *in vivo* u zvířat a u lidí a bylo zjištěno, že má výborné predikční schopnosti. Test 3T3 NRU *in vitro* využívá k predikci fototoxického potenciálu veličinu PIF (http://www.eurochem.cz/index/toxi/443_a2_41.htm).

V předkládané diplomové práci jsme se zabývali hodnocením potenciálních fotosenzibilizačních účinků přírodní látky – hypericinu a chemických látek chloracetamidu, phenmediphamu a bengálské červeně. Experimenty jsme prováděli na dvou modelových organismech – *Tetrahymena thermophila* a *Tubifex tubifex* Müll.

Výpočet fototiriačního faktoru (PIF) v tomto případě sloužil k porovnání fotosenzibilizačních vlastností testovaných látek především u organismu *Tetrahymena thermophila*.

Tabulka 13: Fotoiritační faktory jednotlivých toxinů u tetrahymeny

Poměr EC ₅₀ bez UV / EC ₅₀ s UV	
Bengálská červeň	5,12
Hypericin	5,08
Chloracetamid	2,74
Phenmedipham	4,47

Nejvyšší fototoxický potenciál u prvoka *Tetrahymena thermophila*, se dle našich výsledků zdá být u fototoxického standardu bengálské červeně s hodnotou 5,12. Hypericin, u kterého je PIF = 5,08, je v řadě hned za ním. Obě látky jsou podle stupnice, uvedené v kapitole 3.4., silně fototoxické. Zbylé dvě látky jsou dle našeho experimentu středně silně fototoxické a to v pořadí phenmedipham, chloracetamid.

Fotoiritační faktor u organismu *Tubifex tubifex* pro bengálskou červeň v čase 1 hodina je 1,07. Znamená to, že už po jedné hodině ozařování nitěnky má tato látka středně silný fototoxický potenciál. V časech 2, 3, 4 a 5 hodin by tato hodnota byla ještě mnohem výraznější, jak je názorně vidět při porovnání výsledků v tabulkách č. 2 a č. 3.

Ostatní zkoumané látky v časech 1, 2, 3, 4 a 5 hodin neměly u nitěnky v použitých koncentracích žádný efekt (ani fototoxický ani toxický).

Dle našeho experimentu se tedy dá říci, že organismus *Tetrahymena thermophila* je na testované látky mnohem citlivější než *Tubifex tubifex*.

Různé organismy reagují na stejnou fotosenzibilizační látku v obdobné koncentraci jiným způsobem. Některé organismy daná koncentrace látky zahubí, u jiných nezanechá žádný efekt a u dalších může mít dokonce i opačný účinek a být pro ně přínosná. Je proto důležité studovat nejen samotné fotosenzibilizační vlastnosti daných látek, ale i stanovit efektivní či letální dávky konkrétní látky pro každý testovaný organismus, aby bylo snadnější výsledky experimentů porovnávat a poté je extrapolovat třeba i na člověka. Fotosenzitivní

reakci však neovlivňuje jen koncentrace potenciální fototoxické látky, ale také dávka použitého záření a jeho rozsah, u člověka je také důležitá pigmentace pokožky.

První testovanou látkou je **bengálská červeň**. Bengálská červeň a riboflavin byly společně studovány pro jejich schopnost fotodynamické inaktivace organismu *Bacillus subtilis*, přičemž bengálská červeň se vyznačovala mnohem větší účinností než riboflavin (O'Rourke, J., F., et al., 1992). Současný vliv slunečního záření (nebo UV záření) a fotosenzitizéru jako je například bengálská červeň, riboflavin nebo hematoporfyrin vedou k zabíjení buněk *Tetrahymena pyriformis*. Jejich účinnost při fotoindukované inhibici byla dokázána studií v následujícím pořadí: bengálská červeň největší inhibice, dále riboflavin a nejmenší inhibice dosáhl hematoporfyrin. Pokus probíhal za stejných podmínek (délka - 60 minut a intenzita slunečního záření - především UV oblast) a stejných koncentrací (0,010 mmol/l) jednotlivých látek (Misra, R., B., et al., 1990).

V našich experimentech byla také zkoumána inhibice tetrahymen vlivem potenciálního fotosenzitizéru a UV záření. Látky lze seřadit dle jejich účinnosti při fotoindukované inhibici v pořadí: bengálská červeň největší inhibice, dále chloracetamid, hypericin a nejmenší procentuální inhibice byla zaznamenána u phenmediphamu, hodnotíme-li koncentraci 7. roztoku ozářených tetrahymen, která je srovnatelná se studií Misry a kolektivu z roku 1990. Koncentrace bengálské červeně roztoku číslo 7 byla 0,010 mmol/l, chloracetamidu 0,033 mmol/l, hypericinu 0,132 mmol/l a phenmediphamu 0,086 mmol/l. V našich pokusech jsme sice testovali jiné látky než v uvedené studii, přesto je v obou případech patrné nejefektivnější působení bengálské červeně, fototoxického standardu.

Hodnoty střední efektivní koncentrace, u tetrahymeny s látkou bengálská červeň, jsme stanovili pro ozářené prvky $24hEC_{50} = 0,003$ mmol/l (0,003-0,005 mmol/l) a $24hEC_{50} = 0,017$ mmol/l (0,014-0,019 mmol/l) pro neozářené prvky.

U organismu *Tubifex tubifex* jsme stanovili hodnotu střední letální koncentrace v čase 1 hodina. $1hLC_{50} = 1,230$ mmol/l u ozářených jedinců a $1hLC_{50} = 1,310$ mmol/l u neozářených nitěnek. Fototoxický standard, bengálská červeň, měl po ozáření organismu *Tubifex tubifex* výrazný vliv ve všech testovaných koncentracích (2,500-0,078 mmol/l). Naopak u destičky, která byla temnostní kontrolou, jsme zaznamenali vliv na organismy pouze u prvních dvou koncentrací (2,500-1,250 mmol/l). Látka je tedy výrazně fototoxická. V tomto případě nelze porovnávat ostatní látky se standardem, ani jedna z nich nevykazovala v použitých koncentracích požadovaný fotosenzibilizující efekt (koncentrace: hypericin 4,213-0,132 mmol/l; chloracetamid 2,083-0,065 mmol/l; phenmedipham 2,500-0,078 mmol/l).

Druhou testovanou látkou je **hypericin**. V některých oblastech medicíny je pro své fototoxické účinky široce zkoumán. Uplatnění nabízí při léčbě například karcinomu prsu a leukémii. Častým jevem po podání této látky je fototoxicita epiteliálních buněk oka. Celkově jeho účinek lze snížit současným podáním antioxidantu quercetinu (Mirossay, A., et al., 2002; Wilhelm, K., P., et al., 2001). Hypericin pravděpodobně působí prostřednictvím produkce singletového kyslíku (Miccoli, L., et al., 1998).

V našem experimentu na hypericin reagoval v použité koncentraci pouze organismus *Tetrahymena thermophila*. Hodnota střední efektivní koncentrace byla pro ozářené prvky $24hEC_{50} = 2,022$ mmol/l (1,040-3,901 mmol/l) a pro neozářené $24hEC_{50} = 10,269$ mmol/l (6,437-16,402 mmol/l). Znamená to, že při použití UV záření, byla k dosažení stejného efektu na 50% ze všech organismů zapotřebí mnohem menší koncentrace hypericinu, než při působení látky samotné. Hypericin vykazoval v našich experimentech největší fototoxický potenciál (PIF=5,08), jeho hodnota se velmi blížila hodnotě fototoxického standardu bengálské červeně (PIF=5,12). Druhý organismus *Tubifex tubifex* nebyl touto látkou ovlivněn.

Třetí testovanou látkou je **chloracetamid**. Byl podezříván, že u laboratorních zvířat způsobuje negativní účinky na plodnost a špatný vývoj plodu. Byla proto provedena studie s březími krysami. Chloracetamid byl

podáván v dávkách 0, 3, 12 a 48mg/kg/den a to mezi 7-17 dnem březosti a následně bylo zjištěno, že v tomto případě neměl negativní vliv na vývoj plodu ani jednoho pohlaví (Noda, T., 2002). Chloracetamid společně s ostatními topickými antimikrobiálními přípravky byl použit k testování fotohemolýzy na suspenzi s lidskými erytrocyty. Fototoxický efekt závisel na koncentraci antimikrobiální látky a druhu a dávce UV záření. Jako fototoxické se v této studii jevily pouze dvě látky – bronopol a clioquinol obě v koncentraci 1mmol/l, u chloracetamidu zde tato vlastnost ověřena nebyla (Placzek, M., et al., 2005). Další studie z roku 1972 řeší problém výskytu kontaktního alergického ekzému u 27 lidí způsobeného mastí Hirudoid, která v té době obsahovala konzervační prostředek chloracetamid. Následovalo tedy nahrazení chloracetamidu jinou konzervační látkou (Smeenk, G., et al., 1972). Studie skupiny halogen substituovaných ketonů, esterů a amidů (2-chloracetamid) testuje jejich toxicitu na organismu *Tetrahymena pyriformis*. Reaktivita klesá v pořadí $I > Br > Cl > F$ a zároveň jsou nejvíce reaktivní α -halogensloučeniny. Regresní analýza poukazuje na lineární vztah mezi toxicitou a tiolovou reaktivitou halogenových sloučenin (Schultz, T., M., et al., 2007). Možným mechanismem účinku fotochemické reakce chloracetamidu by mohla být tvorba radikálu chloru reagujícího s buněčnou DNA, jako například u chlorpromazinu (Moore, D., E., 2002).

U tetrahymen jsme z naměřených výsledků vypočítali hodnotu střední efektivní koncentrace $24hEC_{50} = 0,254 \text{ mmol/l}$ (0,215-0,291 mmol/l) u ozářených organismů a hodnotu $24hEC_{50} = 0,696 \text{ mmol/l}$ (0,593-0,817 mmol/l) u neozářených organismů. I v tomto případě byla k inhibičnímu efektu 50% organismů zapotřebí menší koncentrace u ozářených prvoků. Díky experimentu popsaného v naší práci jsme vyhodnotili chloracetamid jako toxickou látku způsobující poškození všech organismů *Tubifex tubifex* ve všech zkoušených koncentracích. Po ozáření nitěnek látka způsobovala také mortalitu všech organismů ve všech zkoušených koncentracích. U neozářených nitěnek jsme zaznamenali 100% mortalitu až do 5. koncentrace a v nejnižší 6. koncentraci byla mortalita 12%. Látka tedy v případě nitěnek nevykazovala efekt fotototoxický, ale pouze toxický.

Čtvrtou testovanou látkou je **phenmedipham**. Jeho vlastnosti byly studovány s dalšími osmi chemikáliemi na organismu *Eisenia andrei*. Hodnocenými parametry byly přežití, růst a reprodukce po třech týdnech expozice daným chemickým látkám. Pro phenmedipham byl nejcitlivějším parametrem hodnocení růst kokonu (Gestel, C., A., M., et al., 1992). V další studii byl zkoumán vliv dešťových srážek na působení herbicidu, který ničí planou hořčici a obsahuje phenmedipham a desmedipham. Studováno bylo několik rostlin. Behrens a Elakkad dokázali, že dešťová srážka 1mm zredukovala toxicitu herbicidu hned u dvou druhů rostlin a déšť o 12,5mm po 8 hodinách aplikace herbicidu snížil toxicitu u mnoha dalších rostlin. Naopak u dřevnatých rostlin se toxicita nesnížila ani, když déšť nastal hned 5 minut po aplikaci herbicidu. Různé rostliny tedy reagují na podanou látku také různě (Monte, D., A., et al., 1985). Jiná studie uvádí efekt těchto dvou herbicidů – desmedipham a phenmedipham na kardiovaskulární systém bílých krys. Po chronické inhalaci dvou uvedených látek nastala změna na EKG. Tyto herbicidy se převážně používají v poměru 12,5ml na 1 litr vody (Egiazaryan, A., R., 1990).

U prvoka *Tetrahymena thermophila* jsme stanovili hodnotu střední efektivní koncentrace $24hEC_{50} = 0,259 \text{ mmol/l}$ (0,221-0,303 mmol/l) pro ozářené organismy a $24hEC_{50} = 1,156 \text{ mmol/l}$ (0,586-2,311 mmol/l) pro organismy neozářené. Testování, které jsme prováděli v této práci s látkou phenmedipham ukázalo, že v použité koncentraci (5,528 - 0,011 mmol/l) neměla testovaná látka žádný vliv na kroužkovce *Tubifex tubifex*.

V experimentech hodnotících fotosenzibilizační vlastnosti látek je nutné pokračovat nejen z hlediska zajímavosti tématu, ale hlavně z hlediska prospěchu pro člověka. Hledání nových poznatků o potenciálních fotosenzibilizačních látkách a metodách jejich zkoumání umožní lepší porozumění problematiky.

6. ZÁVĚR

V experimentech použitých k této práci jsme testovali látky s potenciálním fotosensibilizačním efektem hypericin, chlorcetamid a phenmedipham. Bengálskou červeň, která je standardem používaným k porovnání při hodnocení fototoxicity dalších látek. Testování proběhlo na dvou různých organismech – *Tubifex tubifex* a *Tetrahymena thermophila*.

U prvního testovaného organismu kroužkovce nitěnky jsme stanovili hodnotu střední letální koncentrace pro látku bengálská červeň $1hLC_{50} = 1,23$ mmol/l u ozářených jedinců a $1hLC_{50} = 1,31$ mmol/l u neozářených nitěnek. Ostatní látky ve stejné době a dávce ozáření a porovnatelných koncentracích neměli na nitěnku žádný vliv.

U druhého testovaného organismu prvoka tetrahymeny jsme stanovili hodnotu střední efektivní koncentrace pro látky:

bengálská červeň $24hEC_{50} = 0,0034$ mmol/l (0,0031-0,0054mmol/l) u ozářených a $24hEC_{50} = 0,0174$ mmol/l (0,0137-0,0188mmol/l) u neozářených prvků,

hypericin $24hEC_{50} = 2,0220$ mmol/l (1,0404-3,9014 mmol/l) u ozářených a $24hEC_{50} = 10,2688$ mmol/l (6,4368-16,4023 mmol/l) u neozářených prvků,

chloracetamid $24hEC_{50} = 0,2538$ mmol/l (0,2150-0,2910 mmol/l) u ozářených a $24hEC_{50} = 0,6958$ mmol/l (0,5927-0,8169 mmol/l) u neozářených organismů,

phenmedipham $24hEC_{50} = 0,2591$ mmol/l (0,2214-0,3027 mmol/l) u ozářených a $24hEC_{50} = 1,1564$ mmol/l (0,5857-2,3111 mmol/l) u organismů neozářených.

Citlivějším organismem se zdá být tedy *Tetrahymena thermophila*. Porovnáváme-li látky, působící na tento organismus, největší fototoxický potenciál v našich experimentech vykazoval hypericin (PIF=5,08), jehož hodnota byla téměř totožná se standardem bengálskou červení (PIF=5,12). O něco menší byly hodnoty phenmediphamu (PIF=4,47) a chloracetamidu (PIF=2,74).

PODĚKOVÁNÍ

Na závěr této diplomové práce bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Jitce Vytlačilové za odborné vedení, cenné rady a čas, který této práci věnovala. Dále děkuji mé rodině, která mě podporovala po celou dobu studia.

Tato práce vznikla za podpory grantové agentury SVV UK 265 002.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Alexander, J. D.: Influence of enviromental features on *Tubifex tubifex* and *Myxobolus cerebralis* infected *Tubifex tubifex* in Yelloowstone national park: Implications for whirling disease risk. Montana State University, 2010., 261 s.

Anders, M., Zamrazil, V., a kol.: Remedia kompendium. Panax, Praha. 4. Vyd., 2009, 1000 s.

Bernardová, J.:Fototerapie ultrafialovým světlem. *Dermatol praxi*, 2011, **5**, 98-102.

Buchar, J., Ducháč, V., Hůrka, K., Lellák, J.: Klíč k určování bezobratlých. Scientia, Praha, 1995, 285 s.

Cavalier-Smith, T.: The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2002, **52**, 297–354.

Cuquerella, M., C., Vallet, V., Cadet, J., et al.: Benzophenone Photosensitized DNA Damage. *Acc Chem Res*, 2012, v tisku.

Čepička, I., Kolář, F., Synek, P.: Mutualismus, vzájemně prospěšná symbióza. Národní institut dětí a mládeže MŠMT ČR, Praha, 2007, 87 s.

de Gruijl, F. R., Longstreth, J., Norval, M., et al.: Health effect from stratospheric ozone depletion and interaction with climate change. *Photochem Photobiol*, 2003, **2**, 16–28.

Ditrichová, D.: Fotosenzitivní potenciál léčiv pro zevní i celkové použití. *Med pro praxi*, 2008, **5**, 385.

Dubakiene, R., Kupriene, M.: Scientific problems of photosensitivity. *Medicina*, 2006, **42**, 619–624.

Egiazaryan, A., R.: The effect of desmedipham and phenmedipham on the cardiovascular system of albino rats in the chronic experiment. *Zhurnal Eksperimental'noi i Klinicheskoi Meditsiny*, 1990, **30**, 193-199.

Epstein, J., H.: Phototoxicity and photoallergy. *Semin Cutan Med Surg*, 1999, **18**, 274–284.

Erséus, C.: Phylogeny of oligochaetous Clitellata. *Hydrobiologia*, 2005, **535/536**, 357–372.

Erséus, C., Gustavsson, L.: A proposal to regard the former family Naididae as a subfamily within Tubificidae (Annelida, Clitellata). *Hydrobiologia*, 2002, **485**, 253–256.

Ettler, K.: Účinky UV záření na kůži a fotoprotekce. *Med pro praxi*, 2007, **6**, 273–275.

Fajfr, M., Neubauerová, V., Fajfrová, J.: Akutní průjemová onemocnění-staronový problém. *VZL*, 2010, **79**, 139–145.

Fargašová, A.: Toxicity of metals on *Daphnia magna* and *Tubifex tubifex*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 1994, **27**, 210–213.

Fremuth, F.: Účinky záření a chemických látek na buňky a organismus. SPN, Praha, 1981, 269 s.

Gestel, C., A., M., Dirven-VanBreemen, E., M., Baerselman, R.: Comparison of sublethal and lethal criteria for nine different chemicals in standardized toxicity tests using the earthworm *Eisenia andrei*. *Ecotox Environ Saf*, 1992, **23**, 206–220.

Giere, O.: Meiobenthology. The microscopic fauna in aquatic sediments. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest. 1993, 328 s.

Gould, J., Mercuric, M., Elmet, C.: Cutaneous photosensitivity diseases induced by exogenous agents. *J Am Acad Dermatol*, 1995, **33**, 551–573.

Hausmann, K., Hülsmann, N.: Protozoologie. Academia, Praha, 2003, 348 s.

Helešicová, M.: Základy obecné biologie. Brno, 2012, 144 s.

<http://cs.wikipedia.org/wiki/M%C3%A1lo%C5%A1t%C4%9Btinatci>, staženo 3. 7. 2012

<http://fbmi.sirdik.org/8-kapitola/86.html>, staženo 6. 7. 2012

<http://iuva.org/what-uv>, staženo 26. 6. 2012

http://microbiology.science.oregonstate.edu/barthol_lab_atkinson, staženo 3. 7. 2012

<http://water.mecc.edu/courses/ENV108/lesson6b.htm>, staženo 23. 6. 2012

<http://www.aquariummidaschober.cz/?page=detail&itemid=308>, staženo 5. 7. 2012

http://www.eurochem.cz/index/toxi/443_a2_41.htm, staženo 20. 7. 2012

<http://www.guenther-blaich.de/pflgs.php?par=bimi&lan=e&fm=pflfamla>, staženo 9. 7. 2012

http://www.guh.cz/edu/bi/biologie_bezobratli/html07/foto_003.html, staženo 3. 7. 2012

<http://www.h2o-logic.cz/technicke-aspekty/uv-zareni.html>, staženo 3. 7. 2012

<http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0640.htm>, staženo 2. 7. 2012

http://www.pesticideinfo.org/List_AquireAll.jsp?Rec_Id=PC35159, staženo 20. 7. 2012

<http://www.pirx.com/droplet/gallery/tetrahymena.html>, staženo 2. 7. 2012

http://www.sci.muni.cz/~dobro/ozon_1.htm, staženo 24. 6. 2012

Jirásková, M., Jirásek, L.: Fotoprotekce. *Dermatologie pro praxi*, 2008, **2**, 63.

Khargarot, B., S., Rathore, R., S., Singh, B., B.: pH-dependent toxicity of heavy metals to a freshwater sludgeworm *Tubifex tubifex* Müller. *B Environ Contam Tox*, 2003, **71**, 283–289.

Kim, Y., Rubio, V., Qi, J., et al.: Cancer treatment using an optically inert Rose Bengal derivative combined with pulsed focused ultrasound. *J Control Release*, 2011, **156**, 315-322.

Klaban, V.: Svět mikrobů; ilustrovaný lexikon mikrobiologie životního prostředí. Gaudeamus, Hradec Králové, 2001, 416 s.

Koevary, S., B.: Selective toxicity of rose bengal to ovarian cancer cells *in vitro*. *J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 2012, **4**, 99-107.

Koch, P., Bahmer, F., A.: Photoallergische Dermatoze durch das Herbizid Phenmedipham. *Dermatosen*, 1989, **37**, 203-205.

Kubin, A., Wierrani, F., Burner, U., et al.: Hypericin – The facts about a Controversial agent. *Curr Pharm design*, 2005, **11**, 233-253.

Lagauzère, S., Terrail, R., Bonzom, J-M.: Ecotoxicity of uranium to *Tubifex tubifex* worms (Annelida, Clitellata, Tubificidae) exposed to contaminated sediment. *Ecotoxocol Environ Saf*, 2009, **72**, 527–537.

Lang, J., et al.: Zoologie I. SPN, Praha, 1971, 378 s.

Lang, K., Monsinger, J., Wagnerová, D., M.: Pokroky ve fotochemii singletového kyslíku. *Chem. Listy*, 2005, **99**, 211-221.

Lellák, J., et al.: Biologie vodních živočichů. Univerzita Karlova, Praha, 1982, 220 s.

Lellák, J., Kubíček, F.: Hydrobiologie. Karolinum, Praha, 1992, 257 s.

Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M.: Farmakologie a toxikologie. Grada, Praha, 2004, 725 s.

Maestre, Z., Martinez – Madrid, M., Rodriguez, P.: Monitoring the sensitivity of the oligochaete *Tubifex tubifex* in laboratory cultures using three toxicants. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2009, **72**, 2083-2089.

Malina, L.: Fotodermatózy. Maxdorf, Praha, 1999, 216 s.

Miccoli, L., Beurdeley-Thomas, A., de Pinieux, G., et al.: Light-induced photoactivation of hypericin affects the energy metabolism of human glioma cells by inhibiting hexokinase bound to mitochondria. *Cancer Res*, 1998, **58**, 5777-5786.

Mirossay, A., Mirossay, J., Sarissky, M., et al.: Modulation of the phototoxic effect of hypericin in human leukemia CEM cell line by N-ethylmaleimide, amiloride and omeprazole. *Physiol Res*, 2002, **51**, 641-644.

Misra, R., B., Joshi, P., C.: Phototoxicity evaluation – *Tetrahymena thermophila* as an alternative model. *Indian J Exp Biol*, 1999, **37**, 750–757.

Misra, R., B., Srivastava, L., P., Joshi, P., C.: Phototoxic effects of riboflavin in *Tetrahymena thermophila*. *Indian J Exp Biol*, 1990, **28**, 858–861.

Misra, R., B., Ray, R., S., Hans, R., K.: Effect of UVB radiation on human erythrocytes *in vitro*. *Toxicol in vitro*, 2005, **19**, 433-438.

Misra, R., B., Babu, G., S., Ray, R., S., Hans, R., K.: *Tubifex*: a sensitive model for UVB-induced phototoxicity. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2002, **52**, 288–295.

Monte, D., A., Eugene, W., A.: Rainfall effects on desmedipham and phenmedipham performance. *Weed sci*, 1985, **33**, 391-394.

Moore, D., E.: Drug-induced cutaneous photosensitivity; incidence, mechanism, prevention and management. *Drug Saf*, 2002, **25**, 345–372.

Nečas, O., a kol.: Obecná biologie pro lékařské fakulty. SZN, Praha, 2000, 555 s.

Noda, T., Yamano, T., Shimizu, M.: Pre- and postnatal oral toxicity of biocide 2-chloroacetamide in Wistar rats. *Annu Rep Osaka City Inst Public Health*, 2002, **65**, 1-8.

O'Rourke, J., F., Dowds, B., C.: Dye-mediated photodynamic inactivation of *Bacillus subtilis*. *Biochem Soc T*, 1992, **20**, 76.

Placzek, M., Krosta, I., Gaube, S.: Evaluation of phototoxic properties of antimicrobials used in topical preparations by a photohaemolysis test. *Acta Derm-Venerol*, 2005, **85**, 13-16.

Rychtáriková, R., Kuncová, G.: Imobilizované fotosenzitizátory singletového kyslíku a jejich účinek na mikroorganismy. *Chem. Listy*, 2009, **103**, 800-813.

Schultz, T., W., Ralston, K., E., Roberts, D., W.: Structure-activity relationships for abiotic thiol reactivity and aquatic toxicity of halo-substituted carbonyl compounds. *Sar Qsar Environ Res*, 2007, **18**, 21-29.

Schuster, F., L., Lynn, R-A.: Current World Status of *Balantidium coli*. *Clin Microbiol Rev*, 2008, **21**, 626-638.

Smeenk, G., Prins, F., J.: Allergic Contact Eczema Due to Chloracetamide. *Dermatologica*, 1972, **144**, 108–114.

Stonawski, J.: Základy ekologie. Karolinum nakladatelství UK, Praha, 1993, 218 s.

Teresima, M., N., Iio, H., Harumoto, T.: Toxic and phototoxic properties of the protozoan pigments blepharismine and oxiblepharismine. *Photochem Photobiol*, 1999, **69**, 47-54.

Vacek, J., Klejdus, B., Kubáň, V.: Hypericin a hyperforin: biologicky aktivní komponenty třezalky tečkované (*Hypericum perforatum*). Jejich izolace, analýza a studium fyziologických účinků. *Čes. Slov. Farm.*, 2007, **56**, 62-66.

Van de Putte, M., Roskams, T., Vandenheede J. R., et al.: Elucidation of the tumorigenic principle of hypericin. *Brit J Cancer*, 2005, **92**, 1406-1413.

Van Hoek, A., Van Alen, T., Sprakel, V., et al.: Multiple Acquisition of methanogenic Archeal symbionts by anaerobic Ciliates. *Mol Biol Evol*, 2000, **17**, 251–258.

Walker, J., G.: Oxygen poisoning in the annelid *Tubifex tubifex*. I. Response to oxygen exposure. *Biol Bull US*, 1970, **138**, 235–244.

Wilhelm, K., P., Biel, S., Siegers, C., P.: Role of flavonoids in controlling the phototoxicity of *Hypericum perforatum* extracts. *Phytomedicine*, 2001, **8**, 306-309.